

Synoviale Veränderungen bei fokalen osteocondralen Knorpelschäden im Schafsknie

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

An der Medizinischen Fakultät

der Universität Leipzig

eingereicht von:

Frank Stein

Geburtsdatum / Geburtsort:

10.08.1982. Landau in der Pfalz

angefertigt an der:

Universität Leipzig, Klinik für Orthopädie, Unfallchirurgie und Plastische
Chirurgie

Betreuer / Ko-Betreuer:

Prof. Dr. med. Christoph Josten, PD Dr. med. habil. Bastian Marquaß

Beschluss über die Verleihung der Doktorgrades vom :

29.05.2018

INHALTSVERZEICHNIS

I.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
II.	EINLEITUNG	7
1.	Gelenkknorpel	7
2.	Knorpeldefekte	7
3.	Knorpelmarker.....	9
3.1.	Zytokine	10
3.2.	Matrixmetalloproteinasen	10
3.3.	Glykosaminoglykane	11
III.	AUFGABENSTELLUNG	12
IV.	MATERIAL UND METHODEN	13
1.	Versuchstiere	13
2.	Narkose und Vorbereitung	14
3.	Defektsetzung	15
4.	Biphasisches Konstrukt Implantation.....	16
5.	Osteochondrale Autograft Transplantation (OATS).....	17
6.	Defektentnahme	18
7.	Zwischenpunktionen	18
8.	Probenuntersuchung.....	18
9.	Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer	19
10.	Fluorescence activated cell sorting (FACS)	20
11.	Oviner IL-6 ELISA.....	21
12.	Oviner TNF alpha ELISA:.....	23
13.	MMP Collagenase Assay Kit	24
14.	Glykosaminoglykane Dot Blot:	26
15.	STATISTIK	28
V.	ERGEBNISSE	30

1.	Zellzahlen.....	30
1.1.	Zellzahl x10 ⁴ /ml für Therapie 1.....	30
1.2.	Zellzahl x10 ⁴ /ml für Therapie 2.....	32
1.3.	Vergleich Zellzahl x10 ⁴ /ml.....	34
2.	Zelldifferenzierung.....	34
2.1.	R1 Therapie 1.....	34
2.2.	R1 Therapie 2.....	36
2.3.	Vergleich R1.....	38
2.4.	R2 Therapie 1.....	39
2.5.	R2 Therapie 2.....	41
2.6.	Vergleich R2.....	43
2.7.	R3 Therapie 1.....	44
2.8.	R3 Therapie 2.....	46
2.9.	Vergleich R3.....	48
3.	Zytokine.....	49
3.1.	TNF α Therapie 1.....	49
3.2.	TNF α Therapie 2.....	51
3.3.	Vergleich TNF α.....	53
3.4.	IL-6 Therapie 1 und Therapie 2.....	54
4.	Matrixmetalloproteinasen.....	54
4.1.	MMP Therapie 1.....	54
4.2.	MMP Therapie 2.....	56
4.3.	Vergleich MMP.....	58
5.	Glykosaminoglykane.....	59
5.1.	GAG Therapie 1.....	59
5.2.	GAG Therapie 2.....	61
5.3.	Vergleich GAG.....	63
6.	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	64
VI.	DISKUSSION.....	66
1.	Material und Methodik.....	68
1.1.	Probenentnahme.....	68
2.	Ergebnisse.....	69

2.1.	Knorpelmarker	69
3.	Zellzahl.....	69
4.	Zelldifferenzierung.....	71
4.1.	R1	71
4.2.	R2	73
4.3.	R3	74
5.	Zytokine	74
5.1.	TNF α	74
5.2.	IL-6.....	76
6.	Matrixmetalloproteinasen.....	76
7.	Glykosaminoglykane	78
VII.	ZUSAMMENFASSUNG.....	80
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS.....	83
IX.	SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	88
1.	Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit	88
X.	LEBENS LAUF	89
XI.	DANKSAGUNG	90

I. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

APMA	Aminophenylmercuric Acetat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
CD45	cluster of differentiation 45
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FITC-Kollagen	Fluorescein Isothiocyanate Kollagen
Fl	Fluoreszenz
FSC	Forward Scatter
GAG	Glykosaminoglykane
g	Gramm
HCL-Lösung	Salzsäure Lösung
HRP	Horseradish Peroxidase
ICRS	International Cartilage Repair Society
IgG	Immunglobulin G / Gammaglobulin
IL	Interleukin
i.v.	intravenös
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
M	Molar

MCT	mittelkettige Triglyceride
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMP	Matrix Metalloproteinase
MSC	Mesenchymale Stammzellen
nm	Nanometer
OATS	Osteochondral Autograft Transplantation
O ₂	Sauerstoff
p	p-Wert der Wahrscheinlichkeit
PBS	Phosphate buffered saline
p.o.	per os
S	Summe
SSC	Side Scatter
T	Zeitpunkt
TGF-β3	Transforming growth factor beta 3
Th 1/2	Therapie 1 oder 2
TMB	Tetramethylbenzidine
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
Tween 20	Polysorbat
U	Umdrehungen
λ _{em}	Wellenlänge des emittierten Lichtes
λ _{ex}	Wellenlänge des extingierten Lichtes
μl	Mikroliter

II. EINLEITUNG

1. Gelenkknorpel

Der Gelenkknorpel ist essentiell für die Funktion der Gelenke. Der hyaline Gelenkknorpel ist ein avaskuläres, alymphatisches und aneurales Gewebe. Seine Versorgung erfolgt über Diffusion aus dem Kapillarnetz des subchondralen Knochens und der Synovialflüssigkeit.

Er besteht hauptsächlich aus der extratellulären Matrix (EZM) und nur zu 1-10% aus Zellen, den Chondrozyten. Die extrazelluläre Matrix besteht zu 60 - 80% aus Wasser und zu 20 - 40% aus festen Bestandteilen. Letztere können in Kollagen (ca. 60%), Proteoglykane (ca. 25 - 35%) und nichtkollagene Proteine (ca. 15 - 20%) unterteilt werden. Kollagen II bildet mit 90-95% den Hauptteil der Kollagene in der extrazellulären Matrix, außerdem finden sich noch eine geringe Anzahl von Kollagen VI, IX, X und XI. Dieses Netzwerk aus Kollagenen zusammen mit den langen Proteoglykanen gibt dem Gelenkknorpel seine druckelastische Festigkeit und mechanische Belastbarkeit [1–4].

Aufgrund der Avaskularität führen Schädigungen des Knorpels zu einer Nekrose, jedoch nicht zu einer Regeneration. Undifferenzierte Zellen, die eine Redifferenzierung zu chondrogenen Zellen ermöglichen könnten, können nicht einwandern [5]. Somit geht eine Regeneration nur von den ortständigen Chondrozyten aus, dem einzigen zellulären Element im Knorpel. Substanzverluste bleiben oft bestehen, da die den Defekt umgebenden Chondrozyten nicht in der Lage sind durch Proliferation, Migration oder Synthesesteigerung eine ausreichende Matrixstruktur, ähnlich der des hyalinen Knorpels zu bilden [6]. Somit kommt es bei einem unbehandelten, initial fokalen Knorpeldefekt, im Verlauf zu einem zunehmenden Knorpelverlust, welcher auch den Umgebungsknorpel betrifft.

2. Knorpeldefekte

Man unterscheidet generalisierte, durch degenerative Veränderungen entstandene Gelenkknorpeldefekte von umschriebenen Knorpeldefekten,

entstanden durch Traumata.

Bei degenerativen Knorpelerkrankungen gibt es eine Vielzahl an Risikofaktoren für die Entstehung. Dazu zählen Traumata, das Alter, das Geschlecht, Überbeanspruchung, genetische Prädisposition, Gelenksfehlstellungen und Adipositas. Diese Risikofaktoren können auslösen, dass es zu pathologischen biochemischen Prozessen kommt, bei denen der Knorpel selbst, die Synovialmembran und auch der Knochen beteiligt sind. Bei degenerativen Knorpelerkrankungen liegt eine Inbalance des anabolen hin zum katabolen Stoffwechsel vor. Der Abbauprozess beginnt mit Proteoglykanverlusten der EZM und Auflockerung des kollagenen Netzwerkes, gefolgt von Zellmetaplasie und Zellverlust [7]. Über Jahre führen diese Prozesse zum Abbau des Gelenkknorpels, Bildung von Osteophyten, subchondraler Sklerose, Meniskusschäden, Knochenmarksläsionen, synovialer Proliferation und somit zum Vollbild einer Osteoarthrose [8,9].

Akute traumatische Knorpeldefekte sind meist fokal begrenzt und zeigen meist keine strukturellen Veränderungen des umliegenden Gewebes. Das Knorpelgewebe besitzt nur eine sehr geringe Selbstregenerationskapazität. Fokale Knorpeldefekte erzeugen zwar eine gesteigerte Proliferation und vermehrte Synthese von extrazellulärer Matrix im umliegenden Knorpel, jedoch können solche Läsionen nicht vollständig regeneriert werden [7]. Bei tiefen osteochondralen Defekten mit Durchbruch des kortikalen Knochens kommt es zu einer Einblutung in den Defektbereich. Die im Hämatom enthaltenen Zellen sezernieren Wachstumsfaktoren, die eine fokale Reperatur einleiten und unterstützen [10]. Das entstehende Regenerat zeigt jedoch eher die Charakteristika von Faserknorpel, der dem hyalinen Knorpel mechanisch unterlegen ist [7]. Die geringe Fähigkeit zur Selbstregeneration des Knorpels erzeugt das Problem einer weiteren Degeneration des Gelenks und führt letztendlich zur Osteoarthrose [11]. Dabei kommt es zumeist zu einem pathologischen Ungleichgewicht aus regenerativen und destruktiven Umbauprozessen des Knorpels. Dies führt zu einem progredienten Knorpelverlust [12]. Der kontinuierliche Knorpelverlust ist zum einen auf mechanischen Abrieb zurückzuführen, andererseits kommt es zu einem enzymatischen Abbau

[13]. Bei den neu entstandenen unphysiologischen Druckbelastungen kommt es zu einer veränderten Gelenkhomöostase. Chondrozyten und die Synovialmembran produzieren vermehrt Zytokine und Proteasen (MMP). Dies beschleunigt den ECM-Abbau und fördert somit die weitere Knorpeldestruktion [11,14].

3. Knorpelmarker

Die Analyse und Bestimmung biochemische Marker der Synovialflüssigkeit bietet die Möglichkeit Aufschlüsse über den Knorpel und die allgemeine Gelenksituation zu erhalten. Zum einen handelt sich bei diesen Markern um passive osteochondrale Metabolite oder Abbauprodukte wie die Glykosaminoglykane (GAG). Des Weiteren kann es sich auch um aktive, in den Gelenkstoffwechsel eingreifende Substanzen, wie die Zytokine oder auch knorpelabbauende Enzyme, wie die Matrixmetalloproteinasen (MMP) handeln.

Die Knorpelzerstörung kann primär durch ein Trauma oder degenerative Prozesse ausgelöst werden. Gestartet wird diese Zerstörung durch eine Zytokin-Kaskade und der daraus resultierenden Synthese inflammatorischer Mediatoren. Tumornekrosefaktor alpha (TNF α), Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-6 (IL-6) sind hauptverantwortlich für die Knorpeldegeneration [15]. Im Rahmen der Arthrose werden diese inflammatorischen Zytokine durch Chondrozyten und Mastzellen in der Synovialis gebildet. Diese wiederum senken die Kollagensynthese und erhöhen die Produktion kataboler Proteasen, wie Matrixmetalloproteinasen [14].

Die Spaltung der extrazellulären Matrix setzt wiederum Spaltprodukte, wie die Glykosaminoglykane frei, die dann in der Gelenkflüssigkeit nachgewiesen werden können.

3.1. Zytokine

Zytokine sind eine Gruppe von Peptiden, die auf das Wachstum und auf die Differenzierung von Zellen Einfluss nimmt. Des Weiteren sind sie Mediatoren bei immunologischen Reaktionen. Bei der Arthrose sind TNF α , IL-1 und IL-6 hauptverantwortlich für die Knorpeldegeneration [15,16].

So könne diese die Synthese der Knorpelmatrix unterdrücken [17,18]. Sie können aber auch Chondrozyten zur Synthese von Matrixabbauenden Proteasen wie Kollagenase und Stromelysin aktivieren [19]. Zytokine, wie TNF α , bewirken bei einer aktivierten Synovitis eine vermehrte Genexpression von MMP und somit eine Degradation des Knorpels [2,20–22].

3.2. Matrixmetalloproteinasen

Als Matrixmetalloproteinasen wird eine Gruppe zinkhaltiger Enzyme bezeichnet, die mindestens eine Komponente der extrazellulären Matrix spalten [23]. Diese proteolytischen Enzyme sind Kollagenasen, Gelatinasen, Aggrekanasen und werden direkt von den Chondrozyten, aber auch von der Synovialis gebildet. [2]

Besteht ein Ungleichgewicht zwischen anabolen und katabolen Stoffwechselfvorgängen im Knorpel, so kommt es zu einem Überwiegen des Verlustes an extrazellulärer Matrix. An dieser Knorpeldegradation sind die Matrixmetalloproteinasen beteiligt. Diese enzymatische Aktivität wird komplex reguliert, so führen TNF- α und IL-1 zu einer vermehrten Genexpression der MMP [2]. Somit spiegelt die Enzymatische Aktivität der MMPs die knorpelabbauenden Prozesse wieder [24].

3.3. Glykosaminoglykane

Die Proteoglykane sind Makromoleküle, die aus einem Proteinkern und mehreren kovalent daran gebundenen Zuckerseitenketten, den Glykosaminoglykanen (GAG) bestehen. Die GAG, die sich im Gelenkknorpel finden, sind Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat, Keratansulfat und Dermatansulfat. Hyaluronsäure bildet dabei den zentralen Bestandteil. Die Konzentration der Moleküle variiert innerhalb der Knorpelschichten und wird durch das Alter, Traumata und Erkrankungen des Knorpels beeinflusst [1,4,25–27].

Die Proteoglykane sind stark negativ geladen und binden daher eine große Menge Wasser. Dies wiederum ist verantwortlich für die elastischen Eigenschaften des Gelenkknorpels [25,28].

Proteoglykane und deren Spaltprodukte, die Glykosaminoglykane, sind Bestandteile der extrazellulären Matrix und deren Nachweis in der Synovialflüssigkeit kann als Marker bei Knorpelverletzungen dienen [29,30]. Erhöhte Konzentrationen von Glykosaminoglykanen wurden bei Arthrose und Gelenkverletzungen nachgewiesen [31,32].

III. AUFGABENSTELLUNG

Ziel dieser experimentellen Studie ist die Analyse synovialer Veränderungen im Rahmen der Therapie fokaler osteochondraler Defekte im Großtier durch autologe Knorpelknochen-Zylinder und stammzellbasierte biphasische Konstrukte.

Von besonderem Interesse ist dabei:

- der Zeitpunkt der Defektbehandlung bei einem chronischen Knorpeldefektmodell
- der zeitliche Verlauf der bestimmten synovialen Marker
- mögliche Unterschiede zwischen beiden Therapieoptionen

Diesbezüglich hypothetisieren wir zum einen synoviale Normbedingungen zum Zeitpunkt der Defektbehandlung durch den zeitlichen Abstand von 6 Wochen zur Defektsetzung.

Zum anderen einen stärkeren Anstieg knorpelabbauender Enzyme (MMP), Knorpelabbauprodukte (GAG) und Entzündungsmarker (Zellzahl und TNF- α) im zeitlichen Verlauf bei der biphasischen Gruppe verglichen zur OATS-Gruppe.

IV. MATERIAL UND METHODEN

1. Versuchstiere

Für den Versuch wurden 11 weibliche Merinoschafe im Alter von 22 +/-3 Monaten und einem Gewicht von 68+/-10 Kilogramm zu Versuchsbeginn verwendet.

Bei jedem der Tiere wurde das rechte Knie mit einem biphasischen Stammzellzylinder und das linke als Kontrolle mit einem autologen Knorpelknochen-Zylinder (OATS) therapiert. Primär wurde von allen Kniegelenken vor der Behandlung Synovialflüssigkeit zur Bestimmung der Ausgangswerte entnommen.

Die Untersuchungszeit betrug 54 Wochen. Während dieser Zeit wurde zu 8 definierten Zeitpunkten Synovialflüssigkeit entnommen.

Alle Versuche wurden in Übereinstimmung mit § 8 Abs.1 des deutschen Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 25.05.1998 (BGB.I S. 1105) und den Leitlinien der European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes mit Genehmigung des Regierungspräsidiums Leipzig (TVV 13/07) durchgeführt. Die Schafe waren zwischen den einzelnen Eingriffen und nach Transplantation bis zur Tötung gemeinsam mit ihrer Herde auf den Weiden und in den Ställen des der Universität Leipzig angehörenden Versuchsgutes Oberholz untergebracht. Freilauf und Nahrung wurden nach Belieben gewährt.

Zwei Tage vor einem Eingriff oder ihrer Tötung wurden die Tiere in die Ställe des Medizinisch-Experimentellen Zentrums der Universität Leipzig verlegt und dort 12 Stunden vor dem Eingriff nüchtern gehalten. Zur Vermeidung zusätzlichen Stresses waren die Schafe nie allein untergebracht und befanden sich jederzeit unter Kontrolle einer Fachtierärztin für Versuchstierkunde.

Postoperativ erhielten die Tiere über sieben Tage zweimal täglich Metamizol 1 g p.o (Novaminsulfon, Ratiopharm, Ulm, Deutschland) zur

Analgesie. Bis zum 10. postoperativen Tag wurden Allgemeinzustand, Wundverhältnisse, Belastung der operierten Beine und besondere Vorkommnisse täglich protokolliert.

Frühestens am 10. postoperativen Tag erfolgte der Rücktransport in die Einrichtungen des Versuchsgutes Oberholz.

2. Narkose und Vorbereitung

Unter einer in der Stallung intramuskulär verabreichten Prämedikation mit Atropin (0,02 mg/kg Körpergewicht (KG)), Ketamin (11,0 mg/kg KG, Ketavet 100 mg/ml, Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland) und Xylazin (0,22 mg/kg; Rompun, Bayer Vet AG, Leverkusen, Deutschland) erfolgte der Transport in den Operations-Saal.

Nach Ertasten des Beckenkamms in Seitenlage des Tieres und vorheriger Scherung des Fells wurde eine Punktionsstelle mit Betaisodana desinfiziert. Dann mit einem Trokar (Knochenmark-Aspirationskanüle A-Max 15Gx10 cm, HVM Filtramed GmbH, Rotenburg an der Fulda) die crista iliaca punktiert und unter Heparinzugabe Blut mit Stammzellen aus dem Markraum entnommen. Diese Stammzellen dienten zur Herstellung des biphasischen Konstrukts.

Nach dem Legen eines venösen Zugangs in die V. cephalica antebrachii fand eine endotracheale Intubation und das Legen einer Schlundsonde in Bauchlage statt. Tubus und Sonde wurden mittels Beisskeil fixiert. Dann wurde die Narkose mit Isofluran (Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim Deutschland) über ein Narkosegerät (Dräger Julian, Drägerwerk AG & Co. KGaA, Lübeck Deutschland) inhalativ fortgesetzt. Über ein Tubus-T-Stück wurde Sauerstoff im Flow (8-10 l/min) verabreicht. Initial und nach Bedarf erhielten die Tiere Propofol 1% MCT (10 mg Bolus i.v.) zur Vertiefung der Narkose. Analgetisch ergänzt wurde vor Intubation, vor Schnitt und abhängig von Atem- und Herzfrequenz mit Fentanyl (0,05 mg Bolus i.v.).

Nach Verbringung des Tieres in Rückenlage konnte das Fell über beiden Kniegelenken der Hinterläufe geschoren und die Haut mit Seifenlösung und Wasser gewaschen und entfettet werden. Die Desinfektion des Operations-

Gebietes erfolgte mit dreimaligem Aufbringen von Betaisodona. Danach wurde unter aseptischen Bedingungen steril abgedeckt.

Das operative Monitoring erfolgte über Pulsoximetrie (Kapillare O₂-Sättigung, Herzfrequenz) und Kapnometrie (Expiratorische CO₂-Sättigung, Atemfrequenz). Neben Atem- und Herzfrequenz diente die Prüfung von Lid- und Cornealreflex zur Beurteilung der Narkosetiefe. Angestrebt wurde eine Herzfrequenz < 80/min, eine Atemfrequenz <35/min [33] und ein Ausfall des Lid- bei erhaltenem Kornealreflex. Bei einem O₂-Sättigungsabfall unter 75% oder einem über eine Minute währenden Abfall unter 80% wurde bis zum Wiedereinsetzen einer suffizienten Spontanatmung über den Tubus mit manuellem Beatmungsbeutel (F_{O₂}: 40%) beatmet.

Der Narkoseabbruch erfolgt durch Absetzen der Narkotikazufuhr. Nach Rückkehr des Schluckreflexes wurden die Tiere extubiert.

3. Defektsetzung

Der operative Zugang am Knie des Hinterlaufs erfolgte über einen medialen parapatellaren Hautschnitt und anschließender Präparation bis zur Gelenkkapsel. Nun wurde mit einer Venenverweilkatheter in Richtung des interkondylären Raumes das Gelenk punktiert und steril Synovialflüssigkeit entnommen und mit 50 µl Citratlösung vermischt. Diese wurde nun unmittelbar bis zur Auswertung im Labor auf Eis gelagert. Anschließend wurde das Gelenk eröffnet und der mediale Kondylus freigelegt. Nun wurde mit einem Bohrer (Spezialanfertigung, Aesculap, Tuttlingen) unter Führung in beide mediale Femurkondylen ein fokaler Knorpeldefekt (von 4 mm) in die Hauptbelastungszone gesetzt. Der Defekt reichte bis auf die Knochenlamelle und entspricht einem Knorpeldefekt Grad IV nach ICRS. Der Wundverschluss fand in chirurgischer Dreischichtnaht unter Verwendung resorbierbaren Nahtmaterials (Safil, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) statt. Als Verband diente Aluminiumspray (Veyx-Pharma GmbH, Schwarzenborn, Deutschland). Diese Operation erfolgte an beiden Hinterläufen aller Schafe. Zuletzt wurden die Tiere zurück in die Stallung gebracht.

Die Tiere wurden mindestens 10 Tage auf Wundverhältnisse und Allgemeinzustand überwacht. Zur Analgesie erhielten sie zweimal täglich Metamizol 1 g p.o. (Novaminsulfon, Ratiopharm, Ulm, Deutschland).

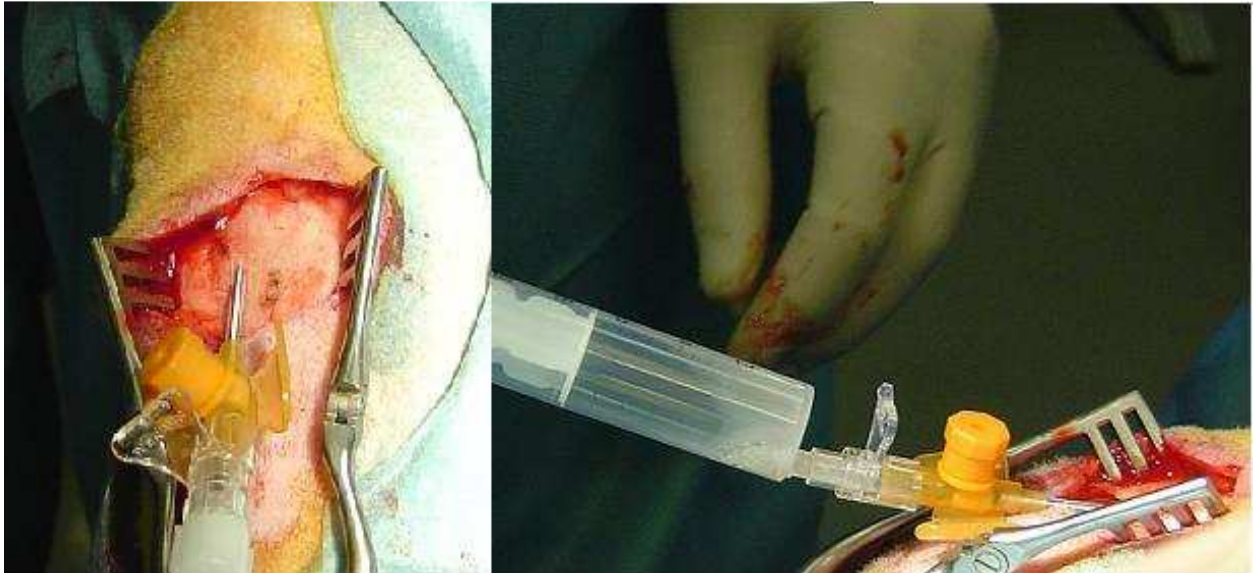


Abb.1: Beispiel einer Entnahme von Synovialflüssigkeit, vor der operativen Defektsetzung am Kniegelenk des Hinterlaufs

4. Biphasisches Konstrukt Implantation

Nach 6 Wochen wurden die Tiere erneut operiert um den vorher gesetzten osteochondralen Defekt mit der Implantation eines stammzellbasierten biphasischen Konstrukt zu therapieren. Im weiteren Text wird die Behandlung mit biphasischen Konstrukten als Therapie 1 (Th1) bezeichnet. Dazu wurden die gleiche Narkose und das gleiche Arthrotomieverfahren verwendet wie bei der Defektsetzung. Dieses biphasische Konstrukt setzt sich zusammen aus einer Knorpelphase und einer Knochenphase, welche beide intraoperativ verbunden wurden mit autologem Plasma. Basis der Knorpelphase war ein Kollagen-I-Hydrogel der Fa. Arthrokinetics, welches mit mesenchymalen Stammzellen besiedelt wurde. Nach Einsaat der Zellen in das Hydrogel erfolgte die chondrogene Differenzierung in zweiwöchiger 3D-Kultur mit TGF- β 3. Die Hydroxylapatit-Basis wurde ebenfalls mit mesenchymalen Stammzellen besiedelt. Diese blieben jedoch undifferenziert.

Die Herstellung dieser Konstrukte ist Teil einer weiteren Arbeit [34] und wird daher an dieser Stelle nicht eingehender erläutert.

Die operative Arthrotomie und das Auffrischen des Defektes wurden wie unter V 3. beschrieben vorgenommen.

Nach Aufbohren des Defektes mit der Hohlfräse wurde das biphasische Konstrukt eingesetzt und mit autologem Plasma fixiert. Zuletzt wurde die Wunde in chirurgischer Dreischichtnaht unter Verwendung resorbierbaren Nahtmaterials (Safil, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) und mittels Aluminiumsprayverband (Veyx-Pharma GmbH, Schwarzenborn, Deutschland) verschlossen. Die Schafe wurden wieder 10 Tage in der Stallung auf Wundverhältnisse beobachtet, bevor sie wieder zur Herde zurückgebracht wurden.

5. Osteochondrale Autograft Transplantation (OATS)

Auf der kontralateralen Seite wurde nach 6 Wochen ebenfalls bei jedem der Schafe ein OATS-Zylindern implantiert. Dies wird im Text als Therapie 2 (Th2) abgekürzt. Dazu wurden die gleiche Narkose und das gleiche Arthrothomieverfahren verwendet wie bei der Defektsetzung.

Nachdem man den chronischen Defekt des medialen Kondylus freigelegt hatte, wurde dieser mit einer 6,4 mm Hohlfräse bis auf eine Tiefe von 12 mm ausgebohrt. Anschließend wurde der Defektzylinder mit einem Graft Harvester (Zimmer, Winterthur, Schweiz) entfernt.

Nun wurde die Patella durch eine erweiterte, parapatelläre Inzision nach lateral mobilisiert und subluxiert.

Nun wurde von der medialen Facette der Trochlea ein 6,6 mm breiter und 12 mm tiefer Knorpelknochen-Zylinder entnommen. Dieser wurde dann im Pressfit-Verfahren in die vorbereitete kondyläre Defektaussparung eingesetzt. Der Wundverschluss fand in chirurgischer Dreischichtnaht unter Verwendung resorbierbaren Nahtmaterials (Safil, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) und mittels Aluminiumsprayverband (Veyx-Pharma GmbH, Schwarzenborn, Deutschland) statt. Die Schafe wurden wieder 10 Tage in der Stallung auf Wundverhältnisse beobachtet, bevor sie wieder zur Herde zurückgebracht wurden.

6. Defektentnahme

Unter der in Kap. V 2. beschriebene Prämedikation wurde den Tieren T61 (0.25 ml/kg KG i.v.; Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) verabreicht. Nach Feststellung des Todes erfolgte die Abtrennung beider Hinterläufe kurz unterhalb des Hüftgelenkes unter weitgehender Belassung der das Kniegelenk umgebenden Muskulatur. Danach wurde unter sterilen Bedingungen das Gelenk eröffnet und eine Entnahme von Synovialflüssigkeit vorgenommen. Die Synovialflüssigkeit wurde mit 50 µl Citratlösung vermischt und bis zur Auswertung im Labor auf Eis gelagert.

7. Zwischenpunktionen

Es wurde zu Beginn der Behandlung zur ersten Operation (Defektsetzung; Zeitpunkt 0) bei allen Schafen Synovialflüssigkeit entnommen. Diese diente zur Bestimmung der Ausgangswerte der zu bestimmenden Marker.

Weitere Kniegelenkspunktionen mit Gewinnung von Synovialflüssigkeit erfolgten 1 und 3 Wochen postoperativ sowie zum Zeitpunkt der Implantation (6 Wochen). Hiernach wurden 2, 6 und 12 Wochen nach der Therapie sowie zum Zeitpunkt der Explantation nach 6 und 12 Monaten Proben entnommen.

Dazu wurden die Schafe mit 2-3 ml Ketamin (Ketavet 100, Pfizer Animal Health, USA) und 0,2-0,3 ml Rompun (0,0375 ml/kg KG, Provet AG, Lyssach, Deutschland) intramuskulär prämediziert. Anschließend wurden die Kniegelenke vor der Punktion dreimalig mit Betaisodana desinfiziert. Dann wurde das Kniegelenk medial der Patella in Richtung interkondylären Raumes mit einer Venenkanüle punktiert und über eine Spritze unter sterilen Bedingungen Synovialflüssigkeit entnommen. Diese Proben wurden mit 50 µl Citratlösung bis zur anschließenden Untersuchung im Labor auf Eis gelagert.

8. Probenuntersuchung

Nach der sterilen Gewinnung von Synovialflüssigkeit wurden diese mit 50 µl Citrat vermischt und auf Eis gekühlt. Umgehend erfolgte der Transport in

das Labor und die dortige Aufarbeitung der Proben.

Es wurde mittels einer Zentrifuge (Heraeus® Biofuge® Fresco, 4000 U/min, 10min) die Zellbestandteile sedimentiert, der Überstand abpipettiert und in mehrere Portionen von 50 µl bis 100 µl aliquotiert. Dieser Überstand wurde für spätere Untersuchungen bei -80°C kryokonserviert und katalogisiert.

Die zellhaltige Restflüssigkeit wurde mit 200 µl Phosphate buffered saline (PBS) gewaschen (4000 U/min, 10min), mit PBS auf die vorherige Gesamtmenge verdünnt und für die Zellzahl-Zählung verwendet.

9. Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer

Nach Verdünnung der Zellsuspension mit PBS-Puffer auf die ursprüngliche Konzentration wurden 20 µl zur Bestimmung der Zellzahl verwendet. Dazu wurde die Lösung mit 1,8%-iger Essigsäure 1:1 verdünnt, um die enthaltenen Erythrozyten zu lysieren, gut gemischt und in die Mitte der Neubauer-Zählkammer (siehe Abb. 3) eingebracht. Bei der folgenden Auszählung der Quadrate wurden alle Großquadrate berücksichtigt und jeweils zwei Quadratgrenzen mit einbezogen (siehe Abb. 4). Die Summe der gezählten Zellen (S) wurde mit der unten aufgeführten Formel (siehe Abb. 2) auf die Zellzahl pro ml umgerechnet.

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{S \times 2}{4} \times \frac{G - 50\mu\text{l}}{G} \times 10^4$$

Abb. 2: Darstellung der Berechnung der Zellzahl $\times 10^4/\text{ml}$ mit **S**=Summe aller gezählten Zellen, **G**=Gesamtmenge der Synovialflüssigkeit (in µl) inklusive 50µl Citratlösung

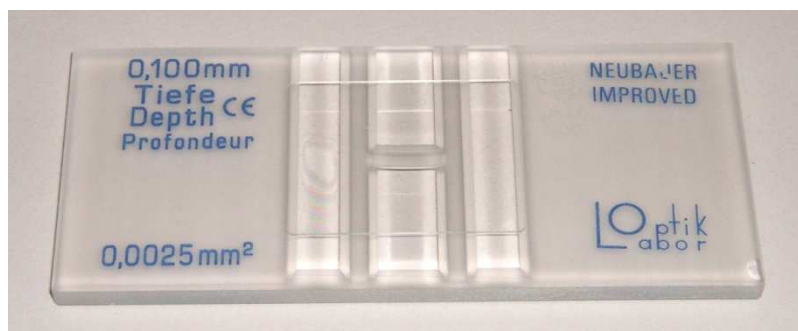


Abb. 3: Beispiel einer Neubauer Zählkammer

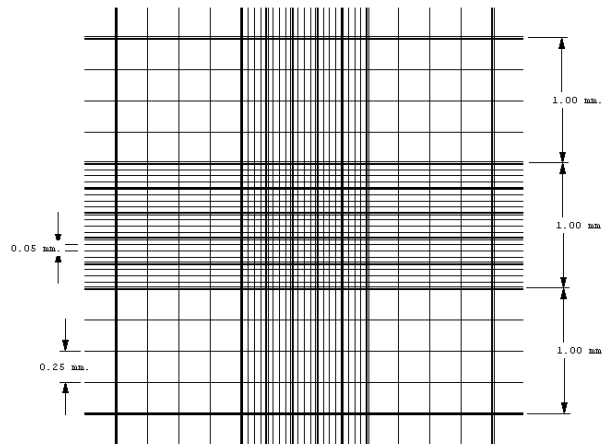


Abb. 4: Schema des Zählfeldes einer Neubauer Zählkammer.

Berücksichtigt wurden die vier großen Quadrate an den Ecken und jeweils zwei Quadratgrenzen mit einbezogen.

10. Fluorescence activated cell sorting (FACS)

Nach der Zentrifugation und Entnahme des Überstandes wurde der zellhaltige Bodensatz zur Zelldifferenzierung verwendet. Zur Differenzierung der Leukozyten in Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten wurde das FACS (FACSscan[®], Becton Dickenson, Mountain View, USA) verwendet. Dazu wurde die zellhaltige Lösung mit 100 µl Lysepuffer (1,8%-iger Essigsäure) gemischt, um die Erythrozyten zu lysieren. Darauf folgte ein zweimaliger Waschschrift (2000 U/min, 3min) mit PBS und Entnahme des Überstandes. Das zellhaltige Sediment wurde zusammen mit 100 µl PBS in eine 96 Well Mikrottestplatte überführt und pro Well 200 µl FACS-Waschpuffer hinzugegeben. Anschließend in einer Zentrifuge bei 1200 U/min, 2 min abzentrifugiert. Die Inkubation mit jeweils 4 µl Antikörper CD45 erfolgte für 30 min bei 4°C. Eine Negativkontrolle mit MultiMix[™] Triple-Colour Control Reagent Mouse IgG wurde bei jedem Schaf mitgeführt. Danach erfolgte ein Waschschrift (1200 U/min, 2min) mit FACS-Waschpuffer. Die Messung und Auswertung erfolgte am Durchflusszytometer (FACSscan[®], Becton Dickenson, Mountain View, USA). Dabei wurden drei Raster mit R1 für Lymphozyten, R2 für Monozyten

und R3 für Granulozyten verwendet (siehe Abb. 5). Die Autofluoreszenz der Negativkontrolle wurde verrechnet.

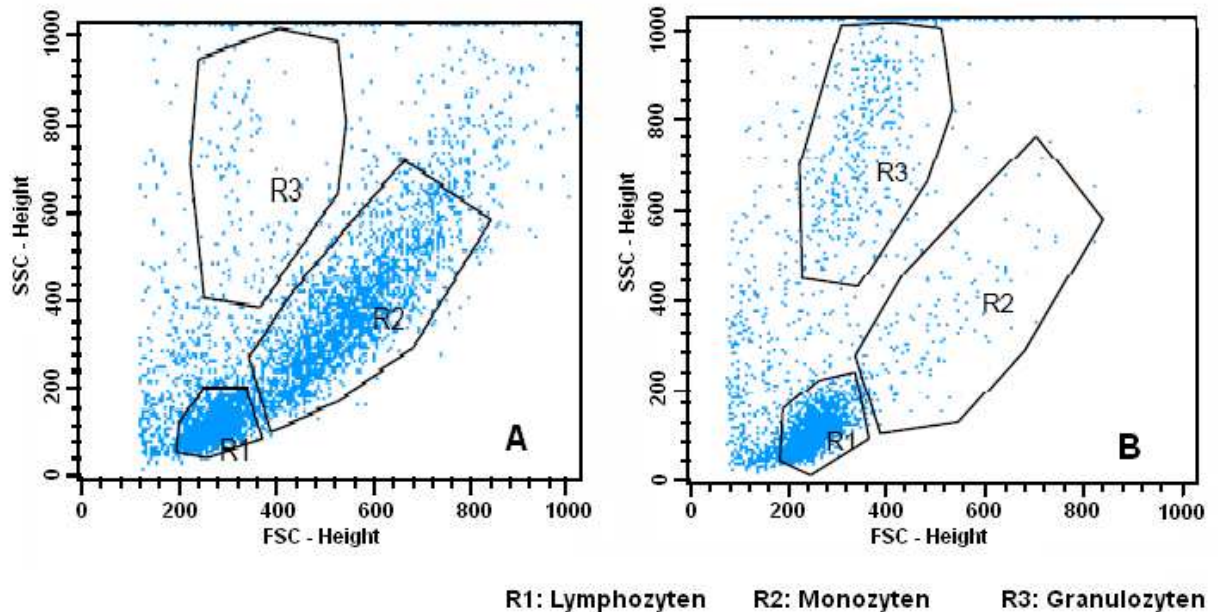


Abb. 5: Beispiel einer FACS Messung mit Einlage der Scanraster von R1-R3.

SSC für Side Scatter/Seitwärtsstreulicht und FSC für Forward Scatter/Lichtbeugung.

11. Oviner IL-6 ELISA

Das IL-6 wurde in der SF mit einem ELISA in Duplikatbestimmung gemessen. Die Nachweisgrenze des ELISAs lag bei 2,5 ng/ml.

1. Beschichten der Platte: Man verwendet je Vertiefung 100 µl des primär Antikörpers: Maus anti sheep IL-6 (Firma: Serotec, Nr. MCA1659) mit einer Konzentration von 1 µg/ml verdünnt mit einem Carbonatpuffer bei pH 9,0 und inkubiert über Nacht bei 4°C im Kühlschrank.
2. 3 mal Waschen mit PBS 0,05% Tween 20 (Polysorbat).
3. Danach blockt man das Well mit PBS 0,01% Tween 20 bei Raumtemperatur für eine Stunde.
4. 3 mal Waschen mit PBS 0,05% Tween 20.
5. Danach Einbringen der Standards mit je 100 µl pro Vertiefung in die

Reihen A bis H. Dazu verwenden der Konzentrationen von: 320, 160, 80, 40, 20, 10, 5, 2,5 ng/ml. Verdünnung der Standard mit PBS 0,01% Tween 20. Verwendeter Standard: rekombinantes bovines IL-6 (Firma: Bio Clon).

6. Dann Einbringen von 50 µl der Synovialflüssigkeit pro Well.
7. Inkubation von Proben und Kontrollen für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur.
8. 3 mal Waschen mit PBS 0,05% Tween 20.
9. Dann Inkubation von 100 µl je Vertiefung mit sekundärem Antikörper: Kaninchen anti Ovin IL-6 (Firma Serotec, Nr. AHP 424) mit einer Verdünnung von 1:500 mit PBS 0,01% Tween 20 für 1 Stunde bei Raumtemperatur.
10. 3 mal Waschen mit PBS 0,05% Tween 20.
11. Inkubation mit je 100 µl des zweiten sekundären Antikörper: Esel anti Kaninchen Biotin Sp-conjugiert (Firma: Dianova, Nr. 711-065-1521) Verdünnt 1:20000 mit PBS 0,01% Tween 20 für 1 Stunde bei Raumtemperatur.
12. 4 mal Waschen mit PBS 0,05% Tween 20.
13. Inkubation mit je 100 µl pro Vertiefung mit Streptavidin-Horseradish Peroxidase (HRP) Konjugat (Firma: Dianova) 1:5000 verdünnt mit PBS 0,01% Tween 20 für 30 min bei Raumtemperatur.
14. 6 mal Waschen mit PBS 0,05% Tween 20.
15. Substratreaktion mit je 100 µl Tetramethylbenzidine (TMB) Substrat (Firma: Pharmingen) für 5-10 min bei Raumtemperatur.
16. Abstoppen der Reaktion mit 100 µl 1M Schwefelsäure je Vertiefung.
17. Auslesen der 96-Well Platte mittels eines ELISA Readers (Spectra mini, Tecan) bei 450 nm (und einer Referenz von 620 nm).

12. Oviner TNF alpha ELISA:

Das TNF α wurde in der Synovialflüssigkeit mit einem ELISA in Duplikatbestimmung gemessen. Die Nachweisgrenze des ELISAs lag bei 1,25 ng/ml.

1. Beschichten der Platte: Man verwendet je Vertiefung 100 μ l des primär Antikörpers: Kaninchen anti bovin TNF α (Firma: Serotec, Nr. AHP 852Z) mit einer Konzentration von 1 μ g/ml verdünnt mit Carbonatpuffer des pHs 9,0 und inkubiert über Nacht bei 4°C im Kühlschrank.
2. 3 mal Waschen mit PBS 0,05% Tween 20.
3. Blocken mit 200 μ l pro Vertiefung PBS 0,05% Tween 20 für 1 Stunde bei Raumtemperatur.
4. 3 mal Waschen mit PBS 0,05% Tween 20.
5. Einbringen der Standards mit je 100 μ l pro Vertiefung in die Reihen A bis H. Dazu verwendet man Konzentrationen von: 160, 80, 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25 ng/ml. Verdünnt wird der Standard mit PBS 0,05% Tween 20. Der verwendete Standard ist: rekombinantes bovines TNF α (Firma: Serotec, Nr. PBP005).
6. Einbringen von 50 μ l der Synovialflüssigkeit pro Well.
7. Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur.
8. 3 mal Waschen mit PBS 0,05% Tween 20.
9. Inkubation mit 100 μ l je Vertiefung des sekundären Antikörpers: Kaninchen anti Bovin TNF α Biotin (Firma: Serotec, Nr. 852B) mit einer Konzentration von 1 μ g/ml verdünnt in PBS 0,05% Tween 20 für 1 Stunde bei Raumtemperatur.
10. 3 mal Waschen mit PBS 0,05% Tween 20.
11. Inkubation mit je 100 μ l Streptavidin-HRP Konjugat (Firma: Dianova) verdünnt 1:5000 in PBS 0,05% Tween 20 für 30 min bei Raumtemperatur.
12. 3 mal Waschen mit PBS 0,05% Tween 20.

13. Substratreaktion mit je 100 µl TMB-Substrat (Firma: Pharmingen) für 5-10 min bei Raumtemperatur.
14. Abstoppen der Reaktion mit 100 µl 1M Schwefelsäure pro Vertiefung.
15. Auslesen der 96-Well Platte an einem ELISA Reader (Spectra mini, Tecan) bei 450 nm (und einer Referenz von 620 nm).

13. MMP Collagenase Assay Kit

Die Matrixmetalloproteinasen wurden mit einem Kollagenase Assay Kit (Chondrex, Redmond, USA) in Doppelbestimmung gemessen. Dieser enthält als Substrat bovines Typ II Kollagen und als Referenz recombinante humane Matrixmetalloproteinasen (MMP) Typ 8. Die Nachweisgrenze des Assay Kits lag bei 0,125 µg/ml.

1. Aktivierung der latenten Prokollagenasen: Zunächst ist es erforderlich die noch inaktiven Prokollagenasen in den Proben mittels 4-aminophenylmercuric-acetat (APMA) zu aktivieren. Man bereitet alle Proben und Referenzen in schwarzen, lichtundurchlässigen Eppendorfröhrchen vor, da das Substrat lichtempfindlich ist.
2. Man verwendet für die Standards je eine Menge von 10, 5, 2.5, 1, 0.5 und 0.25 µl recombinates humanes MMP-8. Dann benötigt man noch ein Röhrchen nur für den Puffer (Buffer), in das kein Substrat gegeben wird, eines ohne Enzyme, in dem die Puffer und nur Substrat gegeben wird (Blank) und eines als 100% Kontrolle in dem das gesamte Substrat durch abkochen denaturiert wird.
3. Dann bereitet man für jede Probe der Synovialflüssigkeit 2mal 50 µl vor. Alle Röhrchen werden mit Puffer B auf eine Menge von 180 µl aufgefüllt.
4. Zugabe von 10 µl APMA hinzu und Inkubation der Proben bei 35°C für 60 min.
5. Nun verdünnt man den mitgelieferten Proteinase Inhibitor mit 1 ml des Puffers B.
6. Anschließend gibt man 10 µl der Proteinase Inhibitor Lösung hinzu,

um die Reaktion zu stoppen.

7. Zuerst bereitet man das Substrat vor, indem man das 2X FITC Kollagen 1:1 mit Puffer A in einem lichtundurchlässigem Gefäß auf Eis verdünnt.
8. Nun gibt man in jedes Röhrchen mit aktivierter Probe 200 µl des verdünnten 2X FITC-Kollagen hinzu und mischt es gut durch.
9. Inkubation der Proben bei 35°C für 75 min. Die 100%Kontrolle wird bei 100°C in einem Wasserbad für 5 min abgekocht.
10. Nach der Inkubation gibt man 10 µl der Stopp Lösung hinzu, um die Enzymreaktion zu beenden und mischt gründlich.
11. Es wird das Enhancer-Reagenz mit 1 ml des Puffers B verdünnt und anschließend 10 µl in jedes Röhrchen hinzugegeben, um das gespaltene Kollagen in weitere kleinere Fragmente zu zerlegen.
12. Inkubation bei 38°C für 20 min.
13. Anschließend lässt man die Proben auf Raumtemperatur abkühlen und gibt nun 400 µl Extraktionslösung hinzu.
14. Nun werden die Röhrchen mit 10.000 U/min für 10 min zentrifugiert.
15. Dann wird zweimal 200 µl jeder Probe aus dem Überstand in eine schwarze 96well-Platte überführt.
16. Messen der Proben mit einem Fluoreszenz-Messgerät (Safire, Tecan, Schweiz) bei $\lambda_{em}=520$ nm und $\lambda_{ex}=490$ nm gemessen.

Errechnen der Kollagenase Aktivität:

$$= \frac{(\text{Flsample} - \text{Flblank}) \times 100 \text{ mg}}{(\text{Flcontrol} - \text{Flbuffer}) \times \text{Reaction Time (minute)} \times \text{Sample Volume (mL)}}$$

Fl= Fluoreszenz

Flbuffer =Fl im Puffer allein;

Flblank =Fl in Blank(Substrat mit allen Lösungen, jedoch ohne Enzyme);

Flcontrol =Fl in 100% Kontrolle (abgekochtes Substrat, ohne Enzyme);

Flsample =Fl in den Proben.

14. Glykosaminoglykane Dot Blot:

Zur Bestimmung der Glykosaminoglykankonzentration in der Synovialflüssigkeit wurde der Alcianblau Nachweis nach S. Björnsson et al. [35,36] verwendet. Die Nachweisgrenze des Verfahrens lag bei 1,25 mg/l.

Verwendete Reagenzien:

1. 8M Guanidin HCL-Lösung: 19,1 g Guanidin-HCL in 25 ml Aqua dest. Lösen, dann mit Aktivkohle abfiltrieren.
2. Alcianblau Stammlösung: 0,018M Schwefelsäure- 0,4M Guanidin HCL-Alcianblau-Stammlösung. Man nehme 0,04 g Alcianblau und gebe es in 9 ml Aqua dest. Dann rühre man die Lösung über Nacht bei 50°C und gebe anschließend 95,9 µl einer 10% Schwefelsäure, 500 µl 8M Guanidin-HCL-Lösung und 404 µl Aqua dest. hinzu. Vor Anmischung des Reagenz 2 sollte die Stammlösung 15 min bei 3000 U/min zentrifugiert werden, um den unlöslichen Anteil des Guanidin HCL zu entfernen.
3. Reagenz 1 (RG 1): 0,054M Schwefelsäure-0,75% Triton X-100-Lösung. Man nehme 30 µl einer 10% Schwefelsäure und 75 µl 10% Triton X-100 und löse es in 895 µl Aqua dest.
4. Reagenz 2 (RG 2): 0,018M Schwefelsäure- 0,25%Triton X-100 Lösung. Man nehme 5 ml der Alcianblau-Stammlösung, 1 ml 10%

Schwefelsäure, 2,5 ml 10% Triton X-100 und mische es mit 91,5 ml Aqua dest.

5. Waschlösung: 50% Ethanol 0,05M Magnesiumchlorid Lösung. Man nehme 50 ml Ethanol und 1,02 g Magnesiumchlorid und mische es mit 50 ml Aqua dest.
6. Standard: Chondroitin-6 Sulfat in den Konzentrationen von 80, 40, 20, 10, 5, 2.5 und 1.25 ml/l.

Durchführung:

7. Einbringen von 10 µl der Probe oder des entsprechendem Standards in eine Vertiefung einer 96-Wellplatte.
8. Zugabe von 20 µl einer 1:1 Mischung aus Reagenz 1 und 8M Guanidin-HCL pro Well.
9. Inkubation 15 min bei Raumtemperatur auf einem Microplate shaker bei 200 U/min.
10. Zugabe von 200 µl Reagenz 2 und Inkubation 60 min bei Raumtemperatur auf einem Microplate shaker bei 200 U/min.
11. Inkubation einer Nitrozellulose-Membran für 60 min in einer 1% Triton X-100-Lösung. Danach Einbringen der Membran in das Dot Blot Gerät (siehe Abb. 6) und darauf gebe man ein mit Waschlösung befeuchtetes Gel Blotting Paper. Luftblasen sind zu vermeiden.
12. Einbringen der Proben in das Dot Blot Gerät und übertragen auf die Nitrozellulose-Membran mittels Vakuums.
13. 2mal waschen mit 200 µl Waschlösung pro Vertiefung.
14. Entnehmen der Nitrozellulose-Membran, waschen in Aqua dest. (Spüllösung, B.Braun) und danach lufttrocknen.
15. Mittels Fotoscanners (CanoScan 3000®, Canon, Tokyo, Japan) wurden die Farbpunkte eingelesen und die Farbtintensität mit Photoshop Cs4 Extendet (Adobe, USA) bestimmt. Aus der Standardreihe lässt sich eine Standartkurve errechnen und die Farbtintensitäten der Proben in Konzentrationen (mg/l) umrechnen.



Abb. 6: Fotografie eines Dot Blot 96 Systems

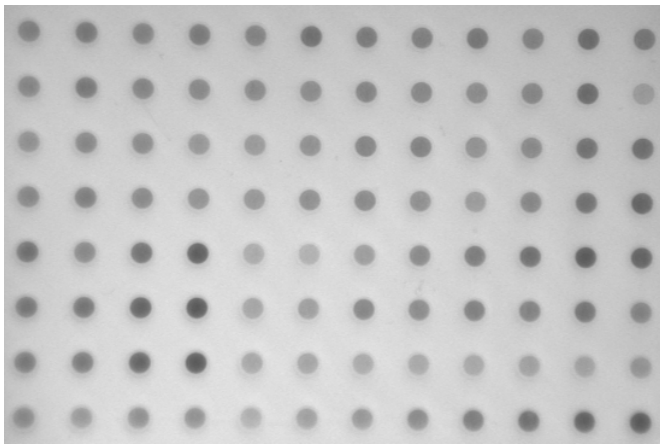


Abb. 7: zeigt ein Schwarz-Weiss-Beispiel eines gescannten Dot Blot Papers

15. STATISTIK

Alle erhobenen Daten wurden in das Statistikprogramm SPSS (Version 15, SPSS, USA) eingegeben und deskriptiv, statistisch und graphisch ausgewertet.

Die in einigen Gruppen nur geringen Stichprobenumfänge machten zur statistischen Auswertung parameterfreie Tests erforderlich. Zur Testung, ob die erhobenen Werte einer gemeinsamen Grundgesamtheit angehören, kam der Test nach Kruskal-Wallis für k-unabhängige Stichproben in Abhängigkeit von der Standzeit zur Anwendung. Ergaben sich hier für

bestimmte Variablen Signifikanzen, wurden diese mittels Mann-Whitney-Test gezielt auf Differenzen untersucht (Signifikanzniveau: $p < 0,05$).

Zur Identifikation von Beziehungen zwischen einzelnen Variablen wurde der Mann-Whitney-Test verwendet (Signifikanzniveau: $p < 0,05$). Die Verwendung dieses Testverfahrens auf die gewonnenen Daten diente dem Vergleich einzelner Werte zum Ausgangswert bei Zeitpunkt 0 (vor Beginn jeglicher Therapie). Die Signifikanz des Testverfahrens wurde mit einem p-Wert von $p < 0,05$ festgesetzt.

V. ERGEBNISSE

1. Zellzahlen

1.1. Zellzahl $\times 10^4/\text{ml}$ für Therapie 1

Hier wird die Gesamtzellzahl in der Synovialflüssigkeit in $10^4/\text{ml}$ vor und nach der Implantation von biphasischen Knorpelkonstrukten beschrieben.

Der Ausgangswert der Zellzahl liegt bei einem Mittelwert von $7,02 \pm 15,6 \times 10^4/\text{ml}$.

Es gibt zwei Höchstwerte bei Woche 1 ($64,4 \pm 81,17 \times 10^4/\text{ml}$) und bei Woche 8 ($21,4 \pm 26,01 \times 10^4/\text{ml}$). Diese Zeitpunkte sind die ersten Messungen nach den Operationsterminen, der Defektsetzung bei Woche 0 und der Therapie bei Woche 6.

Zum Zeitpunkt der Defektsetzung in Woche 6 ($7,6 \pm 12,45 \times 10^4/\text{ml}$) sinken die Werte auf Ausgangsniveau zurück.

Nach der Implantation der biphasischen Konstrukte kommt es im Vergleich zur Defektsetzung zu einem erneuten Anstieg der Zellzahl (Woche 6), auch wenn dieser Anstieg geringer ausfällt.

Nach den Maximalwerten findet man ein Absinken der Werte. Zur Woche 54 sinkt die Zellzahl unter den Ausgangswert auf $3,49 \pm 4,73 \times 10^4/\text{ml}$.

Tab. 1: Ergebnisse der Zellzahl ($\times 10^4/\text{ml}$) der Synovialflüssigkeit vor und nach Implantation biphasischer Konstrukte. Zur Implantation Abfall der Werte auf Ausgangsniveau. Es zeigen sich zwei Maxima, eine Woche nach Defektsetzung und nach Implantation.

Zellzahl Therapie 1 $\times 10^4/\text{ml}$						
Zeitpunkt (Wochen)	Anzahl	Mittelwert	Standard- abweichung	Standard- fehler	Minimum	Maximum
0	10	7,02	15,60	4,93	0,00	50,70
1	9	64,40	81,17	27,06	5,50	255,00
3	7	6,44	5,74	2,17	0,00	15,60
6	11	7,60	12,45	3,75	0,60	44,00
8	9	21,40	26,01	8,67	0	83
12	6	18,61	23,25	9,49	3,68	65,00
30	5	8,03	10,11	4,52	1,00	24,92
54	5	3,49	4,73	2,12	0,00	11,67

Es unterscheiden sich die Zellzahlen der Zeitpunkte 1 Woche und 12 Wochen bei $p < 0,05$ signifikant vom Ausgangswert.

Tab. 2: Vergleich der Ergebnisse der Zellzahl ($\times 10^4/\text{ml}$) der Synovialflüssigkeit nach Implantation biphasischer Konstrukte, im Vergleich zum Ausgangswert. Mit zwei signifikanten Unterschieden zum Zeitpunkt 1 und 12.

Therapie 1 Zellzahl $\times 10^4/\text{ml}$	
Vergleich der Zeitpunkte (Wochen)	p
0 zu 1	0,0025
0 zu 3	0,2588
0 zu 6	0,2044
0 zu 8	0,0539
0 zu 12	0,0167
0 zu 30	0,3255
0 zu 54	0,8529

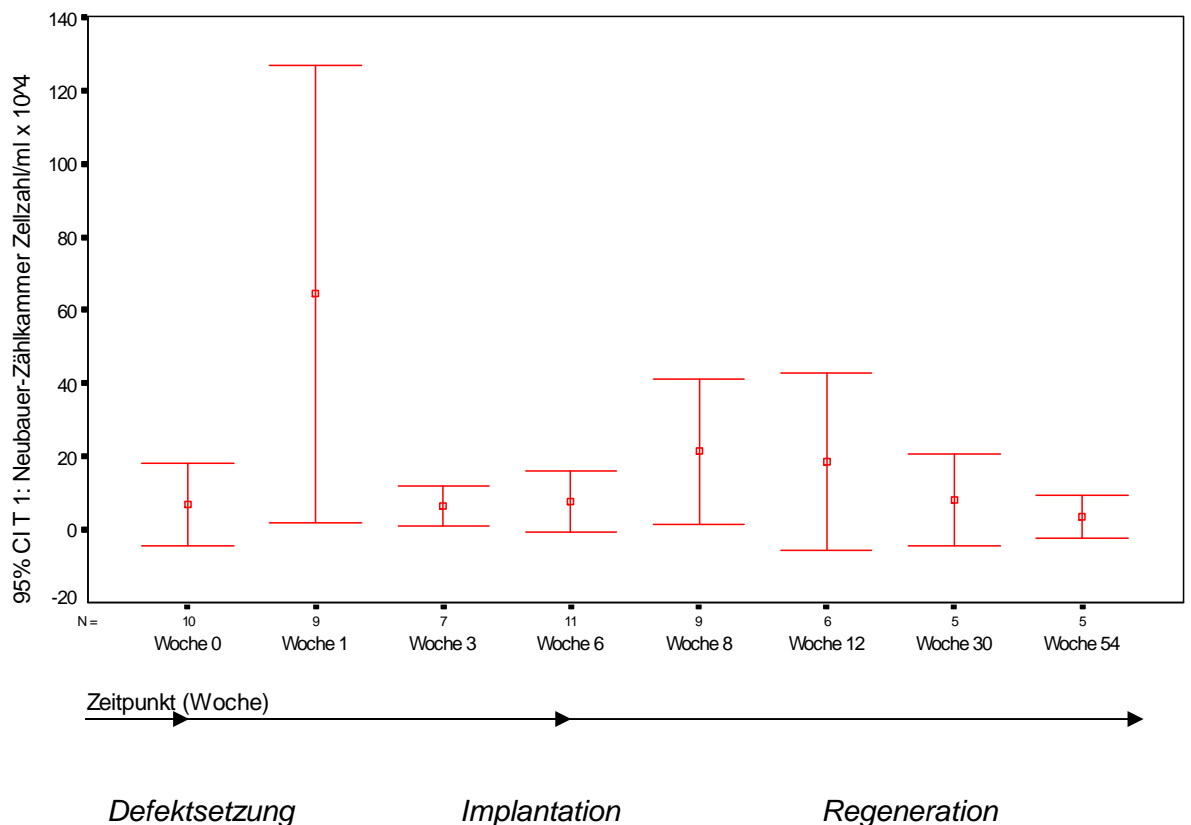


Abb. 8: Darstellung von Mittelwerten mit einem Konfidenzintervall von 95% der Zellzahl ($\times 10^4/\text{ml}$) der Synovialflüssigkeit vor und nach Implantation biphasischer Konstrukte gegen die Zeit in Wochen. Zur Implantation Abfall der Werte auf Ausgangsniveau. Es zeigen sich zwei Maxima, eine Woche nach Defektsetzung

und nach Implantation.

1.2. Zellzahl $\times 10^4/\text{ml}$ für Therapie 2

Hier wird die Gesamtzellzahl in der Synovialflüssigkeit in $10^4/\text{ml}$ vor und nach der Transplantation von OATS-Zylindern beschrieben.

Der Ausgangswert der Zellzahl liegt bei einem Mittelwert von $6,45 \pm 13,09 \times 10^4/\text{ml}$. Es gibt zwei Höchstwerte bei Woche 1 ($34,76 \pm 27,49 \times 10^4/\text{ml}$) und bei Woche 12 ($38,83 \pm 60,67 \times 10^4/\text{ml}$). Hier steigt die Zellzahl zum ersten Mal nach der Defektsetzung und fällt danach wieder ab. Nach der Implantation der OATS-Zylinder zur Woche 6 kommt es zu einem langsameren Anstieg und das zweite Maximum wird zum Zeitpunkt der Woche 12 ($38,83 \pm 60,67 \times 10^4/\text{ml}$) erreicht. Zur Woche 12 gibt es eine große Streuung der Werte. Danach fallen die Werte bis Woche 54 ($7,26 \pm 7,30 \times 10^4/\text{ml}$) wieder ab zu einem Wert nahe des Ausgangswertes.

Tab. 3: Ergebnisse der Zellzahl ($\times 10^4/\text{ml}$) der Synovialflüssigkeit vor und nach Transplantation von OATS-Zylindern. Es zeigen sich zwei Maxima bei Woche 1 und 12. Zum Zeitpunkt 54 Abfall der Werte nahe des Ausgangswertes.

Zellzahl Therapie 2 $\times 10^4/\text{ml}$						
Zeitpunkt (Wochen)	Anzahl	Mittelwert	Standard- abweichung	Standard- fehler	Minimum	Maximum
0	10	6,45	13,09	4,14	0,00	43,50
1	8	34,76	27,49	9,72	1,70	70,00
3	6	12,95	13,29	5,42	1,20	38,30
6	11	8,89	14,49	4,37	1,14	51,00
8	9	22,17	44,04	14,68	0	138
12	5	38,83	60,67	27,13	5,14	146,00
30	5	4,54	6,06	2,71	0,52	15,00
54	5	7,26	7,30	3,26	0,00	16,00

Es zeigen sich zwei signifikante Unterschiede der Zeitpunkte 1 und 12 Wochen vom Ausgangswert bei $p < 0,05$.

Tab. 4: Vergleich der Ergebnisse der Zellzahl ($\times 10^4/\text{ml}$) der Synovialflüssigkeit nach Implantation von OATS-Zylindern, im Vergleich zum Ausgangswert. Mit zwei signifikanten Unterschieden zu Woche 1 und 12.

Therapie 2 Zellzahl $\times 10^4/\text{ml}$	
Vergleich der Zeitpunkte (Wochen)	p
0 zu 1	0,0162
0 zu 3	0,1035
0 zu 6	0,3239
0 zu 8	0,3473
0 zu 12	0,0142
0 zu 30	0,9024
0 zu 54	0,7590

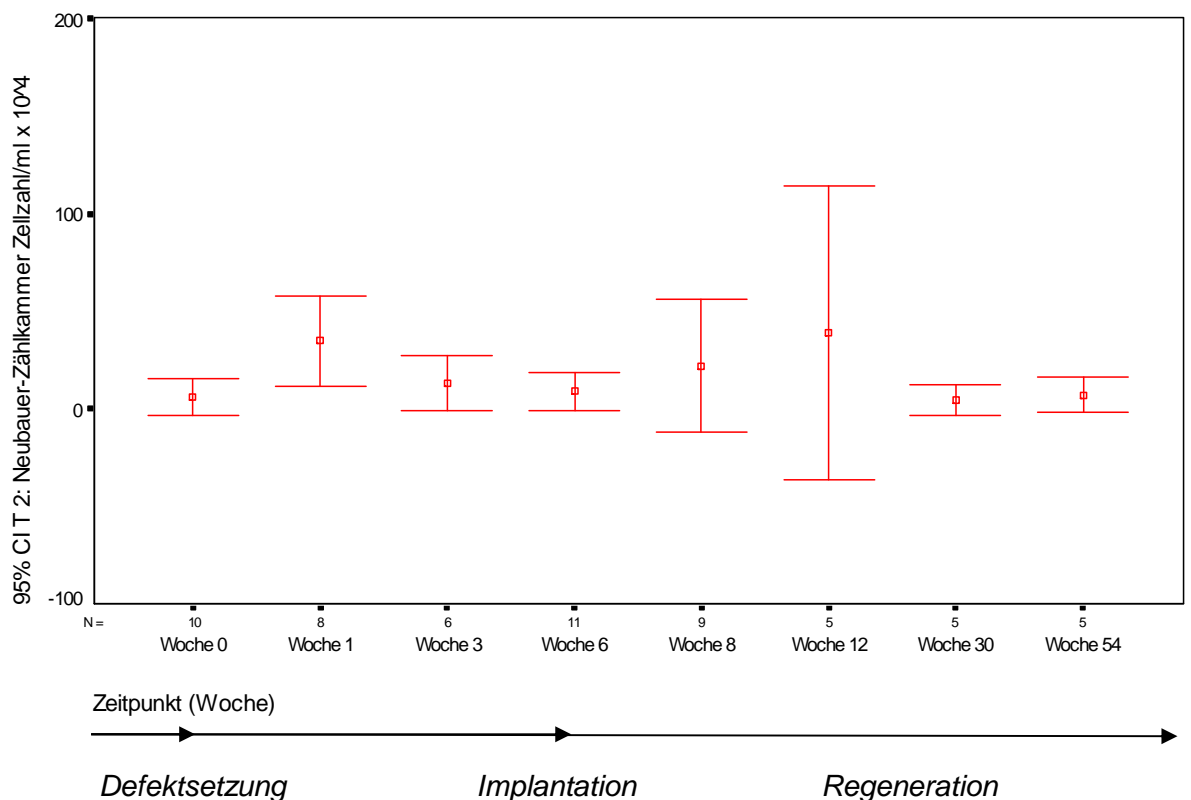


Abb. 9: Darstellung von Mittelwerten mit einem Konfidenzintervall von 95% der Zellzahl ($\times 10^4/\text{ml}$) der Synovialflüssigkeit vor und nach Transplantation von OATS-Zylindern gegen die Zeit in Wochen. Es zeigen sich zwei Maxima bei Woche 1 und 12. Zum Zeitpunkt 54 Abfall der Werte nahe des Ausgangswertes.

1.3. Vergleich Zellzahl $\times 10^4/\text{ml}$

Der statistische Vergleich beider Therapiearten zeigt keinen signifikanten Unterschied bei $p > 0,05$. Es ergeben sich Werte für p zwischen 0,35 bis 0,72.

Die Zellzahl in der Synovialflüssigkeit verhält sich in den beiden Therapiegruppen gleich. Nach der Defektsetzung und der Implantation kommt es bei beiden Gruppen zu einem Maximum mit signifikantem Unterschied zum Ausgangswert zur Woche 1 und 12.

Bei beiden Gruppen kommt es zu einem ersten Maximum in Woche 1. Dabei gibt es bei der Therapiegruppe 1 zwei stark erhöhte Werte zum Zeitpunkt 1. Daher erhöht sich jeweils der Mittelwert als auch die Standardabweichung.

Tab. 5: Ergebnisse der Zellzahl ($\times 10^4/\text{ml}$) der Synovialflüssigkeit vor und nach Implantation biphasischer Konstrukte und Transplantation von OATS-Zylindern mit p -Wert des Mann-Whitney U-Tests. Beide Gruppen verhalten sich gleichläufig mit Anstiegen nach der Defektsetzung und Implantation. Es gibt keine signifikanten Unterschiede beider Gruppen.

Zellzahl $\times 10^4/\text{ml}$					
Zeitpunkt (Wochen)	Mittelwert Therapie 1	Standard- abweichung	Mittelwert Therapie 2	Standard- abweichung	P-Wert
0	7,02	15,60	6,45	13,09	0,57
1	64,40	81,17	34,76	27,49	0,56
3	6,44	5,74	12,95	13,29	0,35
6	7,60	12,45	8,89	14,49	0,72
8	21,40	26,01	22,17	44,04	0,38
12	18,61	23,25	38,83	60,67	0,72
30	8,03	10,11	4,54	6,06	0,46
54	3,49	4,73	7,26	7,30	0,40

2. Zelldifferenzierung

2.1. R1 Therapie 1

R1 zeigt den Lymphozytenanteil, der mit der FACS Zelldifferenzierung, vor und nach der Implantation von biphasischen Konstrukten gemessen wurde.

Der Ausgangswert der Lymphozyten beträgt $188,4 \pm 200$ pro ml.

Nach der Defektsetzung zur Woche 0 steigen die Lymphozyten zum Maximum bei Woche 1 (2737,33+/-3667,01 /ml) an und sinken danach wieder. Nach der Implantation von biphasischen Knorpelkonstrukten zur Woche 6 (182,64+/-224,73 /ml) sind die Werte wieder auf den Ausgangswerte zurückgefallen. Danach steigen die Werte langsam wieder bis zur letzten Messung bei Woche 54 (2845,40+/-5748,83 /ml) an.

Tab. 6: Ergebnisse der Lymphozyten durch die Zelldifferenzierung mittels FACS der Synovialflüssigkeit vor und nach Implantation biphasischer Konstrukte. Zwei Maxima bei Woche 1 und 54. Zur Implantation Absinken der Werte auf Ausgangsniveau.

Zell- differenzierung R1 Therapie 1						
Zeitpunkt (Wochen)	Anzahl	Mittelwert	Standard- abweichung	Standard- fehler	Minimum	Maximum
0	10	188,40	200,54	63,42	9,00	691,0
1	9	2737,33	3667,01	1222,34	320,00	11532,0
3	7	191,00	341,79	129,18	6,00	954,0
6	11	182,64	224,73	67,76	13,00	637,0
8	9	402,44	367,31	122,44	23,00	1197,0
12	6	669,50	863,50	352,52	8,00	2000,0
30	5	1425,80	1587,63	710,01	179,00	4163,0
54	5	2845,40	5748,83	2570,96	98,00	13124,0

Die Zeitpunkte 1 und 30 Wochen unterscheiden sich signifikant vom Ausgangswert bei $p < 0,05$.

Tab. 7: Vergleich der Ergebnisse der Lymphozyten durch die Zelldifferenzierung mittels FACS der Synovialflüssigkeit nach Implantation biphasischer Konstrukte, im Vergleich zum Ausgangswert. Mit zwei signifikanten Unterschieden zu Woche 1 und 30.

Therapie 1 R1	
Vergleich der Zeitpunkte (Wochen)	p
0 zu 1	0,0008
0 zu 3	0,3291
0 zu 6	0,6727
0 zu 8	0,1208
0 zu 12	0,4477
0 zu 30	0,0143
0 zu 54	0,1779

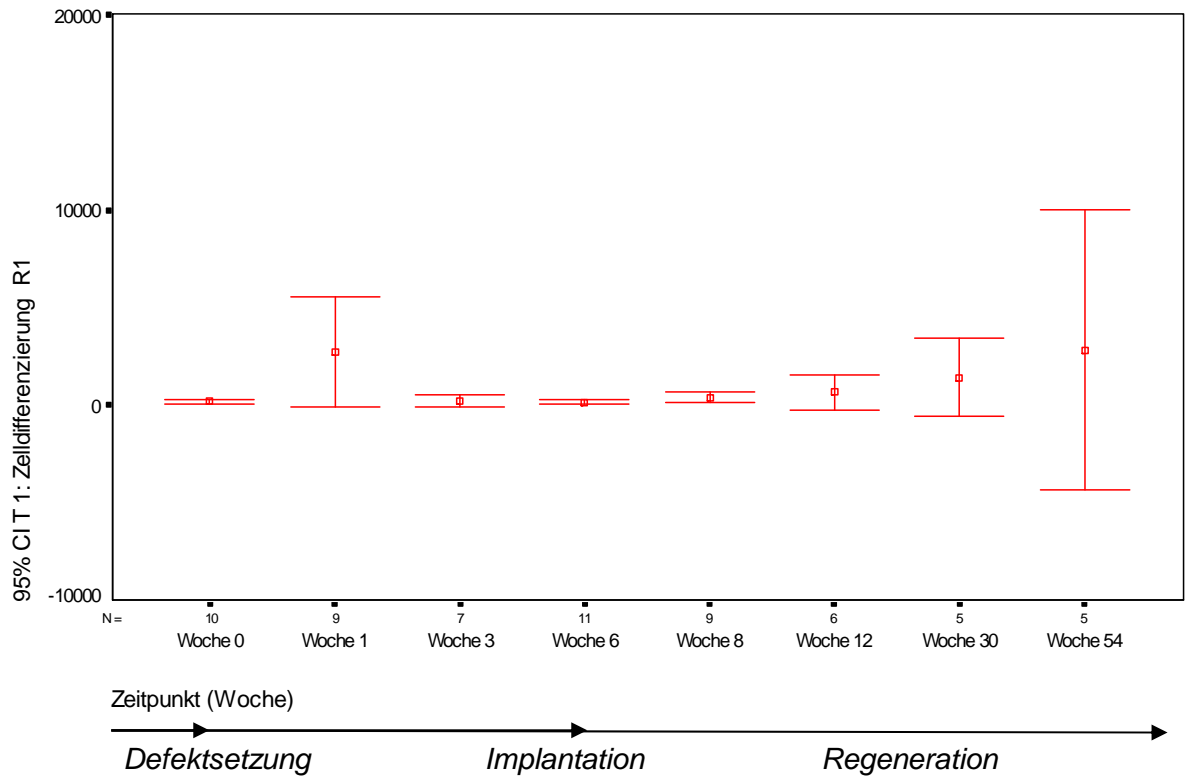


Abb. 10: Darstellung von Mittelwerten (/ml) mit einem Konfidenzintervall von 95% der Lymphozyten durch die Zelldifferenzierung mittels FACS der Synovialflüssigkeit vor und nach Implantation biphasischer Konstrukte gegen die Zeit in Wochen. Zwei Maxima bei Woche 1 und 54. Zur Implantation Absinken der Werte auf Ausgangsniveau.

2.2. R1 Therapie 2

R1 zeigt den Lymphozytenanteil, der mit der FACS Zelldifferenzierung, vor und nach der Transplantation von OATS-Zylindern gemessen wurde.

Hier liegt der Ausgangswert der Lymphozyten höher, bei 553,00+/-441,65 pro ml.

Nach der Defektsetzung zu Woche 0 steigen die Lymphozyten zum Maximum bei Woche 1 (3128,63+/-5215,11 /ml) an und sinken danach wieder ab.

Zur Transplantation der OATS-Zylinder zur Woche 6 (406,64+/-475,32 /ml) liegen die Werte unterhalb des Ausgangswertes. Danach steigen die Werte erneut an und erreichen früher ein niedrigeres Maximum bei Woche 12 (1201,4+/-1386,26 /ml). Danach sinken die Lymphozyten wieder ab und liegen zu Woche 54 (707,4+/-983,89 /ml) etwas über dem Ausgangswert.

Tab. 8: Ergebnisse der Lymphozyten (pro ml) durch die Zelldifferenzierung mittels FACS der Synovialflüssigkeit vor und nach der Transplantation von OATS Zylindern. Zwei Maxima bei Woche 1 und 12. Zur Implantation Absinken der Werte unterhalb des Ausgangsniveaus.

Zell- differenzierung R1						
Therapie 2						
Zeitpunkt (Wochen)	Anzahl	Mittelwert	Standard- abweichung	Standard- fehler	Minimum	Maximum
0	10	553,00	441,65	139,66	19,00	1528,00
1	8	3128,63	5215,11	1843,82	61,00	15453,0
3	6	561,50	1304,64	532,62	2,00	3224,00
6	11	406,64	475,32	143,31	52,00	1609,00
8	9	875,22	519,41	173,14	112,00	1729,00
12	5	1201,40	1386,26	619,95	24,00	3499,00
30	5	311,40	347,79	155,54	20,00	904,00
54	5	707,40	983,89	440,01	93,00	2388,00

Es zeigt sich, dass es keinen signifikanten Unterschied der Messwerte zum Ausgangswert bei $p > 0,05$ der Zelldifferenzierung von R1 bei Therapie 2 gibt.

Tab. 9: Vergleich der Ergebnisse der Lymphozyten durch die Zelldifferenzierung mittels FACS der Synovialflüssigkeit nach Implantation von OATS-Zylindern, im Vergleich zum Ausgangswert. Keine signifikanten Unterschiede zum Ausgangswert.

Therapie 2 R1	
Vergleich der Zeitpunkte (Wochen)	p
0 zu 1	0,0621
0 zu 3	0,0507
0 zu 6	0,2908
0 zu 8	0,1025
0 zu 12	0,5403
0 zu 30	0,2207
0 zu 54	0,7133

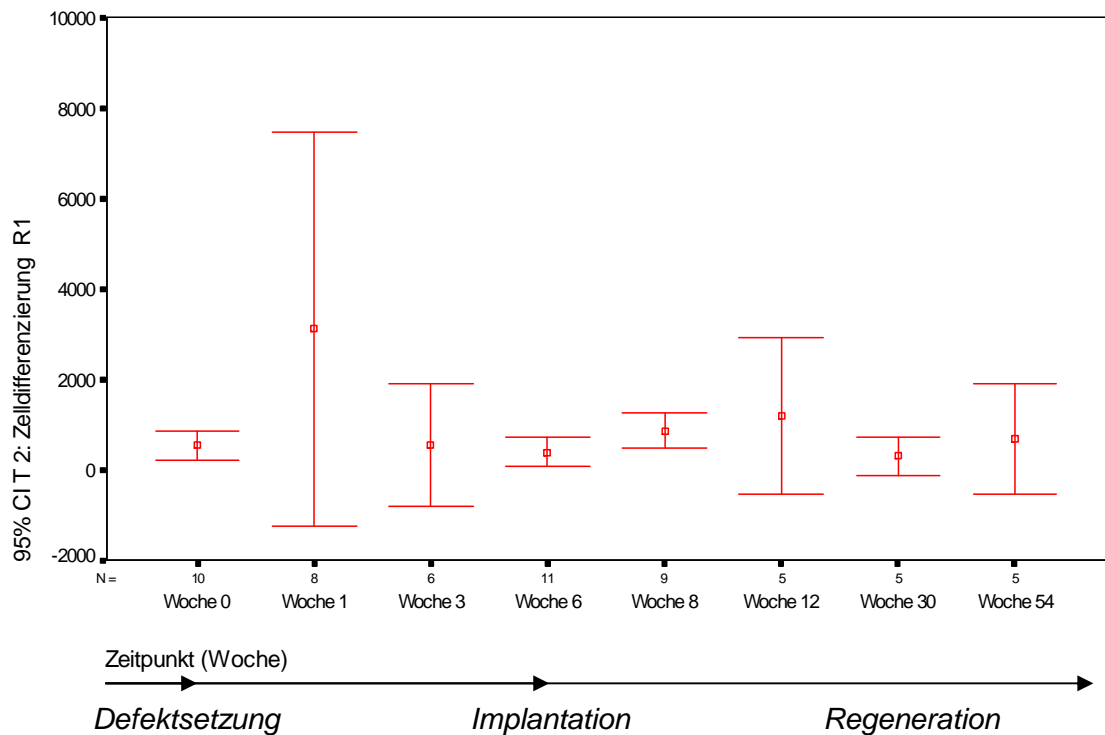


Abb. 11: Darstellung von Mittelwerten mit einem Konfidenzintervall von 95% der Lymphozyten (pro ml) durch die Zelldifferenzierung mittels FACS der Synovialflüssigkeit vor und nach Transplantation von OATS-Zylindern gegen die Zeit in Wochen. Zwei Maxima bei Woche 1 und 12. Zur Implantation Absinken der Werte unterhalb des Ausgangsniveaus.

2.3. Vergleich R1

Die beiden Therapiearten mit biphasischen Konstrukten und OATS-Zylindern unterscheiden sich signifikant in ihrem Ausgangswert bei $p=0,03$. Hier liegt bei der Therapiegruppen mit OATS-Zylindern ein signifikant höherer Ausgangswert ($553\pm 441,65$ /ml) vor.

Ebenfalls bei Woche 8 ist in der zweiten Therapiegruppe (OATS) ein höherer Wert zu finden ($875,22\pm 519,41$ /ml), mit $p=0,05$ jedoch nicht signifikant.

Gegen Ende der Messungen steigt jedoch die Lyphozytenzahl der Therapiegruppe 1 mit biphasischen Konstrukten stetig und höher an. So ist bei Woche 30 nun der Wert ($1425,8\pm 1587,63$ /ml) in der ersten Therapiegruppe wesentlich höher, mit $p=0,05$ jedoch nicht signifikant.

Auch bei Woche 54 ist in der ersten Therapiegruppe der Wert ($2845,4\pm$

5748,83 /ml) im Vergleich zur zweiten Therapiegruppe (707,4+/-983,89 /ml) erhöht. Hier findet sich jedoch bei $p=0,75$ kein signifikanter Unterschied.

Tab. 10: Ergebnisse der Lymphozyten (pro ml) durch die Zelldifferenzierung mittels FACS der Synovialflüssigkeit vor und nach Implantation biphasischer Konstrukte und Transplantation von OATS-Zylindern mit p-Wert des Mann-Whitney U-Tests. Nur signifikanter Unterschied im Ausgangswert.

Zell- differenzierung R1					
Zeitpunkt (Wochen)	Mittelwert Therapie 1	Standard- abweichung	Mittelwert Therapie 2	Standard- abweichung	P-Wert
0	188,40	200,54	553,00	441,65	0,03
1	2737,33	3667,01	3128,63	5215,11	0,96
3	191,00	341,79	561,50	1304,64	0,57
6	182,64	224,73	406,64	475,32	0,12
8	402,44	367,31	875,22	519,41	0,05
12	669,50	863,50	1201,40	1386,26	0,58
30	1425,80	1587,63	311,40	347,79	0,05
54	2845,40	5748,83	707,40	983,89	0,75

2.4. R2 Therapie 1

R2 zeigt den Monozytenanteil, der mit der FACS Zelldifferenzierung, vor und nach der Implantation von biphasischen Konstrukten gemessen wurde.

Der Ausgangswert der der Monozyten beträgt 375,8+/- 353,6 pro ml.

Nach der Defektsetzung zur Woche 0 steigen die Monozyten enorm zu einem Maximum bei Woche 1 (4368,89+/-5044,11 /ml) an und sinken danach rasant ab.

Bereits zur Woche 3 (57+/-59,34) fallen diese unter den Ausgangswert. Nach der Implantation von biphasischen Knorpelkonstrukten zur Woche 6 (57,73+/-69,78 /ml) sind die Werte unterhalb des Ausgangswertes. Danach steigen diese wieder langsam an. Bis zur letzten Messung bei Woche 54 (2083+/-2924,85 /ml) haben die Monozyten ein weiteres Maximum erreicht, dieses ist jedoch nicht so hoch, wie zu Woche 1.

Tab. 11: Ergebnisse der Monozyten (pro ml) durch die Zelldifferenzierung mittels FACS der Synovialflüssigkeit vor und nach Implantation biphasischer Konstrukte. Zwei Maxima zu Woche 1 und 54. Zur Implantation Werte unterhalb des Ausgangsniveaus.

Zell- differenzierung R2						
Therapie 1						
Zeitpunkt (Wochen)	Anzahl	Mittelwert	Standard- abweichung	Standard- fehler	Minimum	Maximum
0	10	375,80	353,60	111,82	19,00	974,00
1	9	4368,89	5044,11	1681,37	210,00	16900,00
3	7	57,00	59,34	22,43	5,00	142,00
6	11	57,73	69,78	21,04	16,00	212,00
8	9	768,22	1335,61	445,20	6,00	4141,00
12	6	585,33	542,63	221,53	14,00	1211,00
30	5	1877,80	1270,68	568,26	711,00	3926,00
54	5	2083,80	2924,85	1308,03	147,00	7068,00

Es unterscheiden sich die Zeitpunkte 1, 3, 6 und 30 Wochen signifikant vom Ausgangswert, bei $p < 0,05$.

Tab. 12: Vergleich der Ergebnisse der Monozyten durch die Zelldifferenzierung mittels FACS der Synovialflüssigkeit nach Implantation biphasischer Konstrukte, im Vergleich zum Ausgangswert. Werte zu Woche 1 und 30 signifikant höher zum Ausgangswert. Zur Implantation (Woche 6) Werte signifikant unter Ausgangswert.

Therapie 1 R2	
Vergleich der Zeitpunkte (Wochen)	p
0 zu 1	0,0015
0 zu 3	0,0317
0 zu 6	0,0151
0 zu 8	0,9349
0 zu 12	0,5152
0 zu 30	0,0071
0 zu 54	0,1416

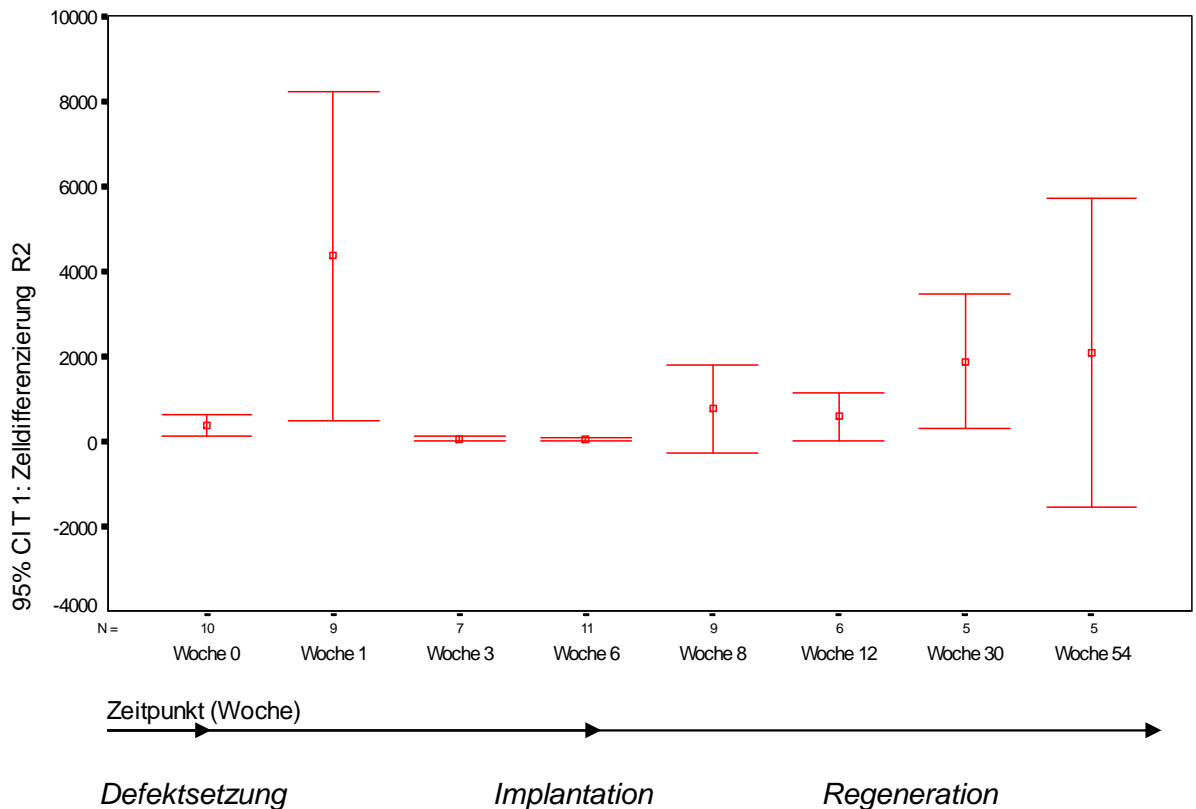


Abb. 12: Darstellung von Mittelwerten (pro ml) mit einem Konfidenzintervall von 95% der Monozyten durch die Zelldifferenzierung mittels FACS der Synovialflüssigkeit vor und nach Implantation biphasischer Konstrukte gegen die Zeit in Wochen. Zwei Maxima zu Woche 1 und 54. Zur Implantation Werte unterhalb des Ausgangsniveaus.

2.5. R2 Therapie 2

R2 zeigt den Monozytenanteil, der mit der FACS Zelldifferenzierung, vor und nach der Transplantation von OATS-Zylindern gemessen wurde.

Hier liegt der Ausgangswert der Monozyten höher, bei $1344,4 \pm 1419,62$ pro ml.

Nach der Defektsetzung zur Woche 0 steigen die Werte zum ersten Maximum bei Woche 1 ($6215,13 \pm 5950,43$ /ml) an und sinken danach bis zur zweiten Operation wieder ab.

Zur Transplantation der OATS-Zylinder zur Woche 6 ($174,64 \pm 115,47$ /ml) liegen die Werte weit unterhalb des Ausgangswertes. Darauf steigen die Werte erneut langsam an und erreichen zwei weitere Maxima bei Woche 8 ($429,78 \pm 360,95$ /ml) und Woche 54 ($608,2 \pm 52072$ /ml). Jedoch liegen diese Werte unterhalb des Ausgangswertes.

Tab. 13: Ergebnisse der Monozyten (pro ml) durch die Zelldifferenzierung mittels FACS der Synovialflüssigkeit vor und nach der Transplantation von OATS Zylindern. Ein Maximum nach der Defektsetzung zu Woche 1. Danach Abfall unter das Ausgangsniveau bis zu Woche 54 trotz erneutem Anstieg.

Zell- differenzierung R2 Therapie 2						
Zeitpunkt (Wochen)	Anzahl	Mittelwert	Standard- abweichung	Standard- fehler	Minimum	Maximum
0	10	1344,40	1419,62	448,92	103,00	4333,00
1	8	6215,13	5950,43	2103,80	205,00	16244,00
3	6	224,33	451,27	184,23	3,00	1136,00
6	11	174,64	115,47	34,82	54,00	461,00
8	9	429,78	360,95	120,32	136,00	1328,00
12	5	180,60	163,30	73,03	25,00	402,00
30	5	382,60	243,28	108,80	49,00	718,00
54	5	608,20	520,72	232,87	158,00	1404,00

Es unterscheiden sich die Zeitpunkte 3 und 6 Wochen signifikant vom Ausgangswert bei Betrachtung der Zelldifferenzierung von R2 bei Therapie 2.

Tab. 14: Vergleich der Ergebnisse der Monozyten durch die Zelldifferenzierung mittels FACS der Synovialflüssigkeit nach Implantation von OATS-Zylindern, im Vergleich zum Ausgangswert. Zeitpunkte 3 und 6 liegen signifikant unterhalb des Ausgangswertes.

Therapie 2 R2	
Vergleich der Zeitpunkte (Wochen)	P
0 zu 1	0,0756
0 zu 3	0,0146
0 zu 6	0,0060
0 zu 8	0,3691
0 zu 12	0,0500
0 zu 30	0,3913
0 zu 54	0,3913

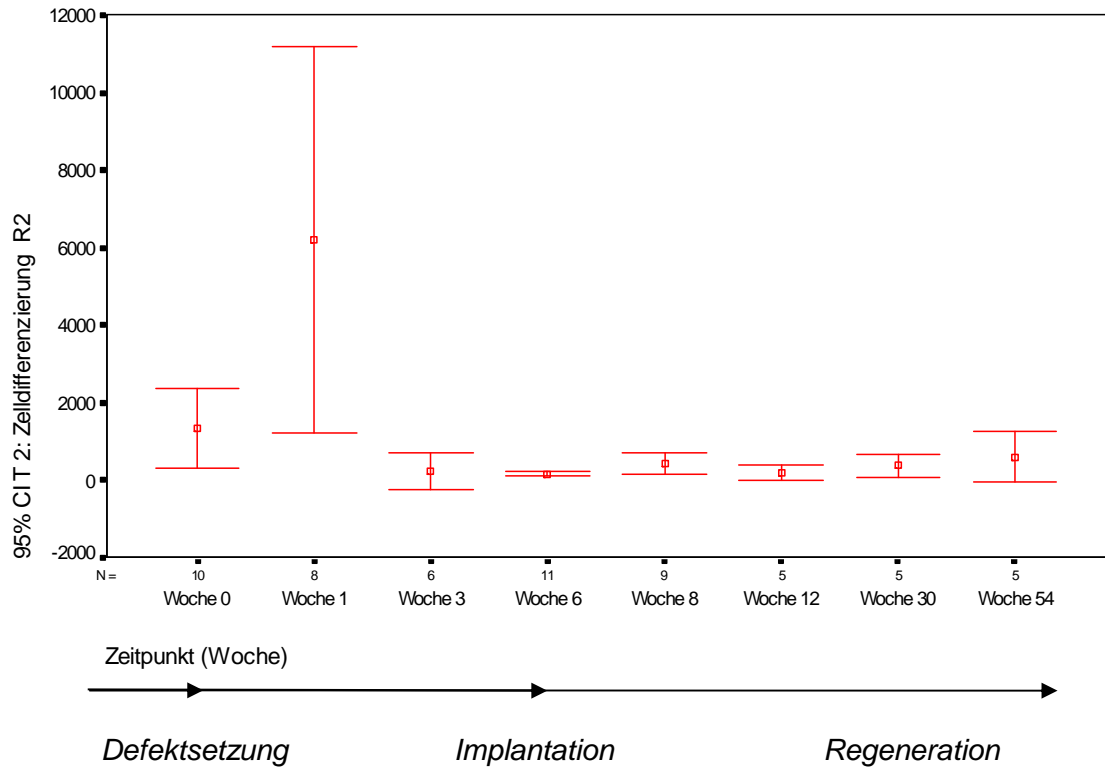


Abb. 13: Darstellung von Mittelwerten (pro ml) mit einem Konfidenzintervall von 95% der Monozyten durch die Zelldifferenzierung mittels FACS der Synovialflüssigkeit vor und nach Transplantation von OATS-Zylindern gegen die Zeit in Wochen. Ein Maximum nach der Defektsetzung zu Woche 1. Danach Abfall unter das Ausgangsniveau bis zu Woche 54 trotz erneutem Anstieg.

2.6. Vergleich R2

Die beiden Therapiearten mit biphasischen Konstrukten und OATS-Zylindern unterscheiden sich in ihrem Ausgangswert der Monozyten mit $p=0,08$ jedoch nicht signifikant. Hier liegt bei der Therapiegruppe mit OATS-Zylindern ein höherer Ausgangswert von $1344,4 \pm 1419,62$ /ml vor. Hingegen bei der Gruppe mit den biphasischen Konstrukten ist ein Ausgangswert von nur $375,8 \pm 353,6$ /ml zu messen.

Ebenfalls unterscheiden sich die beiden Gruppen zur Woche 6 zur Implantation mit $p=0,01$ signifikant. Hier ist der Monozyten-Wert in der ersten Gruppe ebenfalls niedriger bei $57,73 \pm 69,78$ /ml. Hingegen bei der zweiten Gruppe ist er zu Woche 6 bei $174,64 \pm 115,47$ /ml.

Bei beiden Gruppen steigen die Monozyten nach der Implantation an. Hingegen bei der ersten Gruppe (biphasische Konstrukte) steigen die Werte schneller und über den Ausgangswert. Wohingegen bei der Gruppe mit

OATS-Zylindern die Werte langsamer steigen und nicht über den Ausgangswert kommen.

So liegt zur Woche 30 mit $p=0,02$ ein weiterer signifikanter Unterschied der beiden Gruppen vor. Hier ist die Gruppe mit biphasischen Konstrukten signifikant höher bei $1877,80\pm 1270,68$ /ml. Die Gruppe mit OATS-Zylindern jedoch nur bei $382,60\pm 243,28$ /ml.

Tab. 15: Ergebnisse der Monozyten (pro ml) durch die Zelldifferenzierung mittels FACS der Synovialflüssigkeit vor und nach Implantation biphasischer Konstrukte und Transplantation von OATS-Zylindern mit p-Wert des Mann-Whitney U-Tests. Beide haben ein Maximum zur Woche 1. Danach Abfall unter das Ausgangsniveau. Zwei signifikante Unterschiede zu den Zeitpunkten 6 und 30.

Zell- differenzierung R2					
Zeitpunkt (Wochen)	Mittelwert Therapie 1	Standard- abweichung	Mittelwert Therapie 2	Standard- abweichung	P-Wert
0	375,80	353,60	1344,40	1419,62	0,08
1	4368,89	5044,11	6215,13	5950,43	0,66
3	57,00	59,34	224,33	451,27	1,00
6	57,73	69,78	174,64	115,47	0,01
8	768,22	1335,61	429,78	360,95	0,45
12	585,33	542,63	180,60	163,30	0,36
30	1877,80	1270,68	382,60	243,28	0,02
54	2083,80	2924,85	608,20	520,72	0,75

2.7. R3 Therapie 1

R3 zeigt den Granulozytenanteil, der mit der FACS Zelldifferenzierung, vor und nach der Implantation von biphasischen Konstrukten gemessen wurde.

Der Ausgangswert der Granulozyten beträgt $192,2\pm 228,73$ pro ml.

Nach der Defektsetzung zum Zeitpunkt 0 steigen die Granulozyten zum Maximum bei Woche 1 ($3033,89\pm 4322,11$) an. Danach sinken sie ab und liegen zur Implantation der biphasischen Konstrukte unterhalb des Ausgangswertes bei Woche 6 ($56,64\pm 38,54$ /ml).

Nun steigen die Granulozyten erneut zu einem zweiten Maximum bei Woche 8 ($2268,78\pm 5965,93$ /ml) an. Zur letzten Messung bei Woche 54 sind die Werte mit $137,20\pm 90,2$ /ml unterhalb des Ausgangswertes gefallen.

Tab. 16: Ergebnisse der Granulozyten (pro ml) durch die Zelldifferenzierung mittels FACS der Synovialflüssigkeit vor und nach Implantation biphasischer Konstrukte. Zwei Maxima bei Woche 1 und 8. Zur Implantation liegen Werte unterhalb des Ausgangsniveaus.

Zell- differenzierung R3 Therapie 1						
Zeitpunkt (Wochen)	Anzahl	Mittelwert	Standard- abweichung	Standard- fehler	Minimum	Maximum
0	10	192,20	228,73	72,33	19,00	766,00
1	9	3033,89	4322,11	1440,70	117,00	11308,00
3	7	86,57	99,59	37,64	5,00	273,00
6	11	56,64	38,54	11,62	13,00	125,00
8	9	2268,78	5965,93	1988,64	10,00	18162,00
12	6	1223,17	2534,35	1034,65	26,00	6383,00
30	5	474,40	520,78	232,90	55,00	1271,00
54	5	137,20	90,23	90,23	31,00	212,00

Zum Zeitpunkt 1 Woche liegen die Werte signifikant höher zum Ausgangswert, bei $p < 0,05$ bei Betrachtung der Zelldifferenzierung von R3 bei Therapie 1.

Tab. 17: Vergleich der Ergebnisse der Granulozyten durch die Zelldifferenzierung mittels FACS der Synovialflüssigkeit nach Implantation biphasischer Konstrukte, im Vergleich zum Ausgangswert. Das Maximum zum Zeitpunkt 1 unterscheidet sich signifikant vom Ausgangswert

Therapie 1 R3	
Vergleich der Zeitpunkte (Wochen)	p
0 zu 1	0,0055
0 zu 3	0,1719
0 zu 6	0,0782
0 zu 8	0,2885
0 zu 12	0,5152
0 zu 30	0,3272
0 zu 54	1,0000

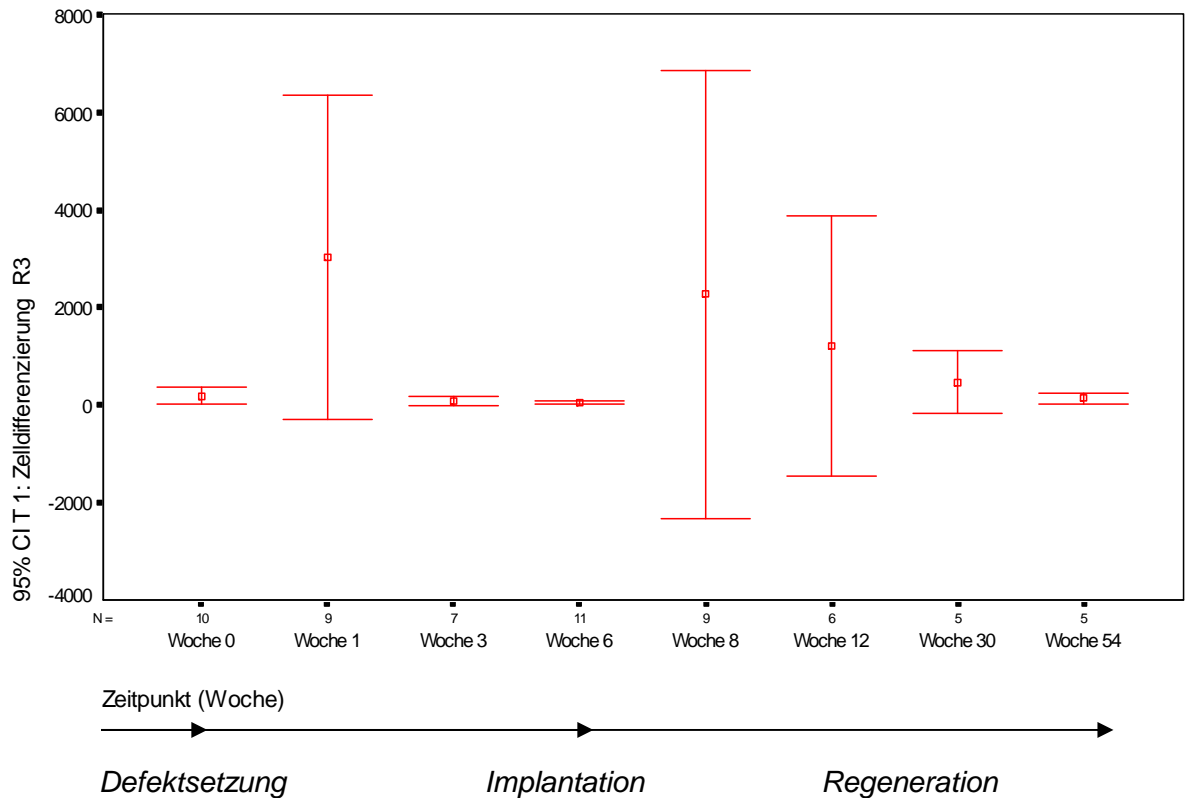


Abb. 14: Darstellung von Mittelwerten (pro ml) mit einem Konfidenzintervall von 95% der Granulozyten durch die Zelldifferenzierung mittels FACS der Synovialflüssigkeit vor und nach Implantation biphasischer Konstrukte gegen die Zeit in Wochen. Zwei Maxima bei Woche 1 und 8. Zur Implantation liegen Werte unterhalb des Ausgangsniveaus.

2.8. R3 Therapie 2

R3 zeigt den Granulozytenanteil, der mit der FACS Zelldifferenzierung, vor und nach der Transplantation von OATS-Zylindern gemessen wurde.

Hier liegt der Ausgangswert der Granulozyten höher, bei 560,1+/-1035,67 pro ml.

Nach der Defektsetzung zum Zeitpunkt 0 steigen die Granulozyten zum Maximum bei Woche 1 (3012,13+/-3304,95 /ml) an und sinken danach wieder ab.

Zur Transplantation der OATS-Zylinder zur Woche 6 (199,45+/-253,78 /ml) liegen die Werte unterhalb des Ausgangswertes. Danach steigen die Werte nochmals leicht bis Woche 8 auf 872,11+/-662,61 /ml an. Sinken danach aber stetig ab bis weit unterhalb des Ausgangswertes bei Woche 54 mit 77,20+/-55,55 /ml.

Tab. 18: Ergebnisse der Granulozyten (pro ml) durch die Zelldifferenzierung mittels FACS der Synovialflüssigkeit vor und nach der Transplantation von OATS Zylindern. Zwei Maxima bei Woche 1 und 8. Zur Implantation und Woche 54 Werte unterhalb des Ausgangsniveaus.

Zell- differenzierung R3 Therapie 2						
Zeitpunkt (Wochen)	Anzahl	Mittelwert	Standard- abweichung	Standard- fehler	Minimum	Maximum
0	10	560,10	1035,67	327,51	23,00	3446,0
1	8	3012,13	3304,95	1168,48	33,00	8554,0
3	6	161,67	229,17	93,56	10,00	620,0
6	11	199,45	253,78	76,52	28,00	916,0
8	9	872,11	662,61	220,87	100,00	1728,0
12	5	765,00	903,26	403,95	42,00	2100,0
30	5	48,40	27,72	12,40	8,00	76,0
54	5	77,20	55,55	24,84	47,00	176,0

Die Zeitpunkte 1 und 30 Wochen unterscheiden sich signifikant vom Ausgangswert, bei $p < 0,05$ bei Betrachtung der Zelldifferenzierung von R3 bei Therapie 2.

Tab. 19: Vergleich der Ergebnisse der Granulozyten durch die Zelldifferenzierung mittels FACS der Synovialflüssigkeit nach Transplantation von OATS Zylindern, im Vergleich zum Ausgangswert. Zum Zeitpunkt 1 liegen die Werte signifikant über und zum Zeitpunkt 30 signifikant unter dem Ausgangsniveau.

Therapie 2 R3	
Vergleich der Zeitpunkte (Wochen)	p
0 zu 1	0,0209
0 zu 3	0,1931
0 zu 6	0,3600
0 zu 8	0,1025
0 zu 12	0,9024
0 zu 30	0,0101
0 zu 54	0,0500

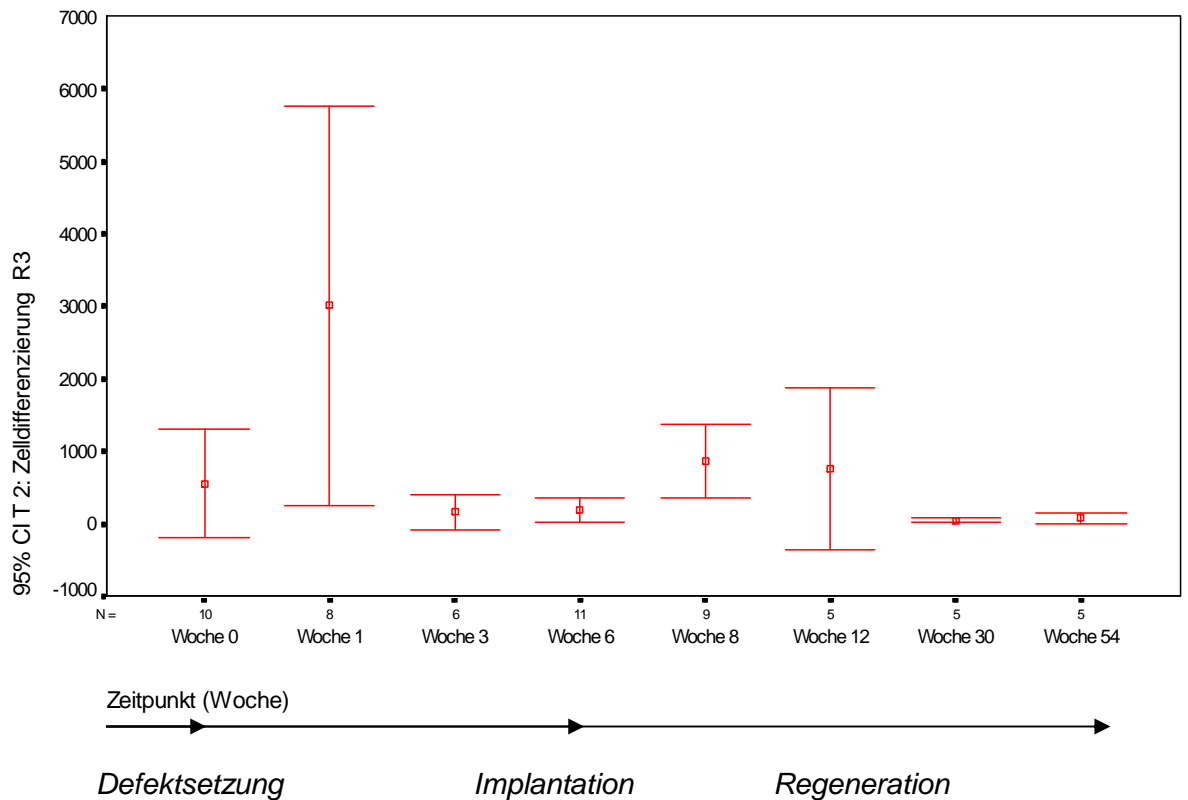


Abb. 15: Darstellung von Mittelwerten (pro ml) mit einem Konfidenzintervall von 95% der Granulozyten durch die Zelldifferenzierung mittels FACS der Synovialflüssigkeit vor und nach Transplantation von OATS-Zylindern gegen die Zeit in Wochen. Zwei Maxima bei Woche 1 und 8. Zur Implantation und Woche 54 Werte unterhalb des Ausgangsniveaus.

2.9. Vergleich R3

Bei beiden Gruppen steigen die Granulozyten nach der Defektsetzung stark an und sinken danach unterhalb des Ausgangswertes zur Implantation zum Zeitpunkt 6 ab. Die beiden Therapiearten mit biphasischen Konstrukten und OATS-Zylindern unterscheiden sich signifikant im Wert zum Zeitpunkt 6 mit $p=0,02$. Hier liegt der Wert der Granulozyten bei der Therapiegruppen 2 (OATS) signifikant höherer, mit $T6\ 199,45\pm 253,78\ /ml$. Die Gruppe 1 mit biphasischen Konstrukten hat einen Wert von $T6\ 56,64\pm 38,54\ /ml$.

Nach der Therapie zur Woche 6 gibt es einen erneuten Anstieg mit einem erneuten Maximum bei beiden Gruppen zu Woche 8. Jedoch ist dieser Anstieg nicht so hoch, wie nach der Defektsetzung.

Danach fallen bei beiden Gruppen die Granulozyten wieder unterhalb des

Ausgangswertes ab.

Ebenfalls unterscheiden sich die beiden Gruppen zum Zeitpunkt 30 mit $p=0,08$ jedoch nicht signifikant. Hier ist der Granulozyten-Wert in der ersten Gruppe mit biphasischen Konstrukten erhöht zum Zeitpunkt 30 mit $474,40 \pm 520,78$ /ml. Hingegen bei der zweiten Gruppe ist er zum Zeitpunkt 30 bei $48,40 \pm 27,72$ /ml.

Tab. 20: Ergebnisse der Monozyten (pro ml) durch die Zelldifferenzierung mittels FACS der Synovialflüssigkeit vor und nach Implantation biphasischer Konstrukte und Transplantation von OATS-Zylindern mit p-Wert des Mann-Whitney U-Tests. Beide haben ein Maximum zum Zeitpunkt 1 und 8. Zur Implantation unterscheiden sich beide Gruppen signifikant.

Zell- differenzierung R3					
Zeitpunkt (Wochen)	Mittelwert Therapie 1	Standard- abweichung	Mittelwert Therapie 2	Standard- abweichung	P-Wert
0	192,20	228,73	560,10	1035,67	0,29
1	3033,89	4322,11	3012,13	3304,95	0,88
3	86,57	99,59	161,67	229,17	0,39
6	56,64	38,54	199,45	253,78	0,02
8	2268,78	5965,93	872,11	662,61	0,12
12	1223,17	2534,35	765,00	903,26	0,58
30	474,40	520,78	48,40	27,72	0,08
54	137,20	90,23	77,20	55,55	0,53

3. Zytokine

3.1. TNF α Therapie 1

Hier werden die Ergebnisse der Messung des TNF α -Gehalts in der Synovialflüssigkeit vor und nach der Implantation von biphasischen Knorpelkonstrukten beschrieben.

Der Ausgangswert des TNF α liegt bei $39,89 \pm 38,99$ ng/ml.

Nach der Defektsetzung zum Zeitpunkt 0 steigt der Gehalt an und erreicht bei Woche 1 mit $180,21 \pm 169,19$ ng/ml das erste Maximum. Danach sinken die Werte wieder ab und liegen zur Implantation bei Woche 6 mit $27,58 \pm 9,07$ ng/ml unterhalb des Ausgangswertes.

Danach steigen die Werte erneut an und erreichen bei Woche 8 mit $112,7 \pm$

123,4 ng/ml das zweite Maximum.

Zur Woche 12 (42,63+/-32,36 ng/ml) und Woche 30 (41,70 ng/ml) sinken die Werte wieder ab.

Zur Woche 54 lagen uns keine Proben vor und somit konnten keine Werte bestimmt werden.

Tab. 21: Ergebnisse des TNF α -Gehalts (ng/ml) der Synovialflüssigkeit vor und nach Implantation biphasischer Konstrukte. Es zeigen sich zwei Maxima zum Zeitpunkt 1 und 8. Zur Implantation lagen die Werte unter dem Ausgangsniveau.

Zytokine Therapie 1 TNF alpha (ng/ml)						
Zeitpunkt (Wochen)	Anzahl	Mittelwert	Standard- abweichung	Standard- fehler	Minimum	Maximum
0	7	39,89	38,99	14,74	20,00	127,30
1	9	180,21	169,19	56,40	50,10	564,20
3	5	106,84	47,79	21,37	42,70	163,80
6	4	27,58	9,07	4,54	20,00	38,10
8	8	112,70	123,40	43,63	35	403
12	5	42,63	32,36	14,47	20,00	99,70
30	1	41,70	-	-	41,70	41,70
54	0	-	-	-	-	-

Die Zeitpunkte 1, 3 und 8 Wochen unterscheiden sich signifikant vom Ausgangswert, bei $p < 0,05$ bei Betrachtung des TNF α -Gehalts bei Therapie 1.

Tab. 22: Vergleich der Ergebnisse des TNF α -Gehalts der Synovialflüssigkeit nach Implantation biphasischer Konstrukte, im Vergleich zum Ausgangswert. Die Maxima bei 1 und 8 unterscheiden sich signifikant vom Ausgangswert.

Therapie 1 TNF α	
Vergleich der Zeitpunkte (Wochen)	P
0 zu 1	0,0049
0 zu 3	0,0177
0 zu 6	1,0000
0 zu 8	0,0144
0 zu 12	0,5621
0 zu 30	0,2636
0 zu 54	-

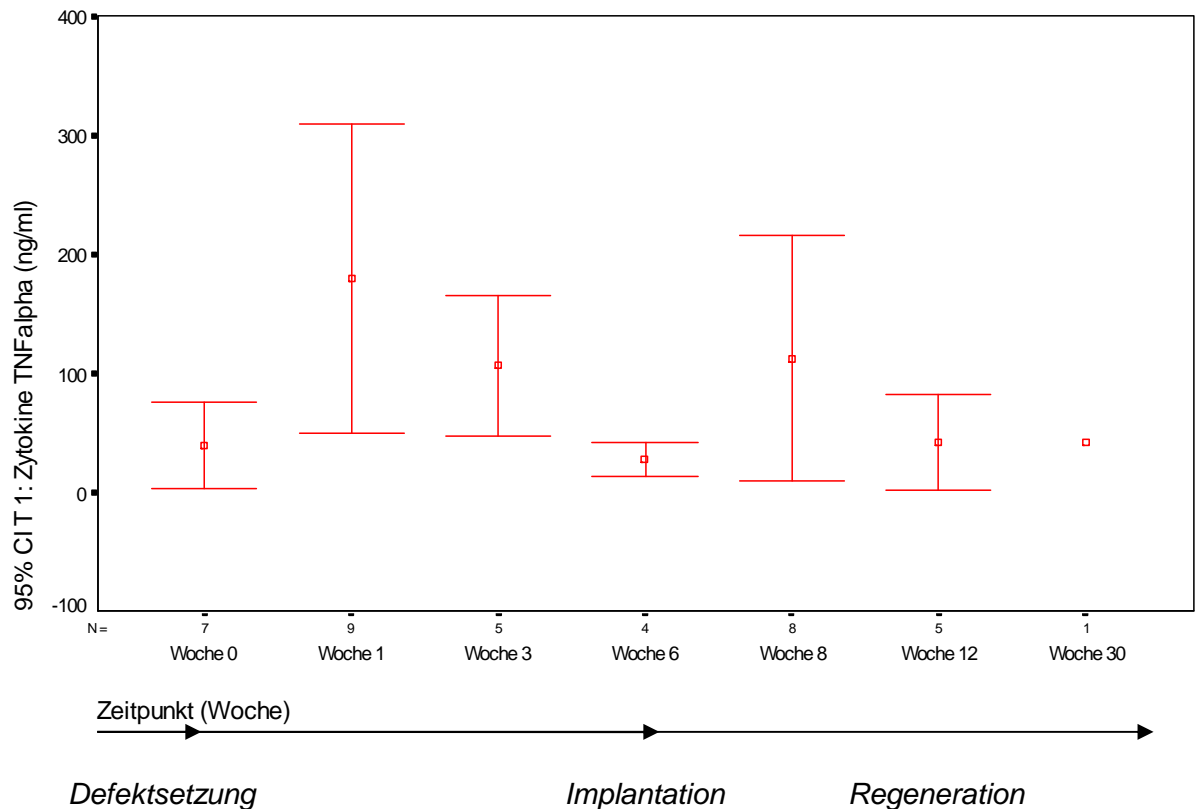


Abb. 16: Darstellung von Mittelwerten (ng/ml) mit einem Konfidenzintervall von 95% des TNF α -Gehalts der Synovialflüssigkeit vor und nach Implantation biphasischer Konstrukte gegen die Zeit in Wochen. Es zeigen sich zwei Maxima zum Zeitpunkt 1 und 8. Zur Implantation lagen die Werte unter dem Ausgangsniveau.

3.2. TNF α Therapie 2

Hier wird der TNF α -Gehalt in der Synovialflüssigkeit vor und nach der Transplantation von OATS-Zylindern beschrieben.

Der Ausgangswert des TNF α -Gehalts liegt bei einem Mittelwert von 39,89 \pm 38,99 ng/ml.

Auch hier steigt nach der Defektsetzung zum Zeitpunkt 0 der Gehalt an und erreicht bei Woche 1 mit 140,09 \pm 63,59 ng/ml das erste Maximum.

Danach fallen die Werte ebenfalls wieder ab und liegen bei der Transplantation zur Woche 6 mit 31,03 \pm 22,05 ng/ml knapp unterhalb des Ausgangswertes.

Dann steigen die Werte ebenfalls schnell an und erreichen das zweite Maximum bei Woche 12 mit 109,30 \pm 160,04 ng/ml.

Nachfolgend standen uns leider keine Proben und somit keine Ergebnisse zur Verfügung.

Tab. 23: Ergebnisse des TNF α -Gehalt (ng/ml) der Synovialflüssigkeit vor und nach Transplantation von OATS-Zylindern. Es zeigen sich zwei Maxima zum Zeitpunkt 1 und 12. Zur Implantation Absinken der Werte auf Ausgangsniveau.

Zytokine TNF alpha (ng/ml)						
Therapie 2						
Zeitpunkt (Wochen)	Anzahl	Mittelwert	Standard- abweichung	Standard- fehler	Minimum	Maximum
0	8	36,60	13,63	4,82	20,00	54,30
1	7	140,09	63,59	24,03	85,20	233,40
3	5	100,80	72,28	32,33	56,30	226,20
6	4	31,03	22,05	11,02	20,00	64,10
8	8	106,56	94,34	33,35	39	263
12	4	109,30	160,04	80,02	20,00	348,50
30	0	-	-	-	-	-
54	0	-	-	-	-	-

Die Zeitpunkte 1, 3 und 8 Wochen unterscheiden sich signifikant vom Ausgangswert, bei $p < 0,05$ bei Betrachtung des TNF α -Gehalts bei Therapie 2.

Tab. 24: Vergleich der Ergebnisse des TNF α -Gehalt des Synoviapunktates nach Transplantation von OATS Zylindern, im Vergleich zum Ausgangswert. Die Werte zum ersten Maximum und zu den Zeitpunkten 3 und 8 unterscheiden sich signifikant zum Ausgangswert.

Therapie 2 TNF α	
Vergleich der Zeitpunkte (Wochen)	P
0 zu 1	0,0012
0 zu 3	0,0034
0 zu 6	0,3786
0 zu 8	0,0117
0 zu 12	1,0000
0 zu 30	-
0 zu 54	-

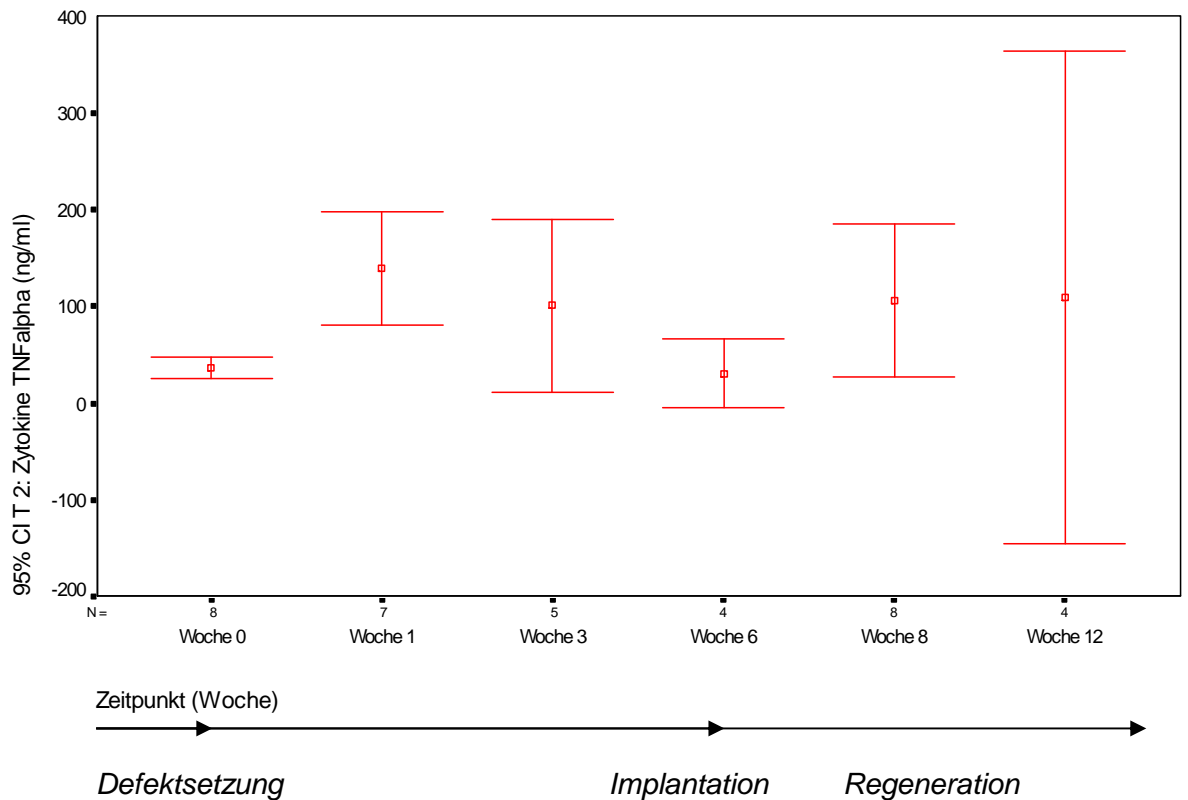


Abb. 17: Darstellung von Mittelwerten (ng/ml) mit einem Konfidenzintervall von 95% des TNF α -Gehalt der Synovialflüssigkeit vor und nach Transplantation von OATS-Zylindern gegen die Zeit in Wochen. Es zeigen sich zwei Maxima zum Zeitpunkt 1 und 12. Zur Implantation Absinken der Werte auf Ausgangsniveau.

3.3. Vergleich TNF α

Beide Therapiegruppen unterscheiden sich bei $p > 0,05$ zu keinem der Zeitpunkte signifikant in ihren Werten. Es ergeben sich Werte für p zwischen 0,35 bis 1,0.

Bei beiden Therapiegruppen kommt es zunächst eine Woche nach der Defektsetzung zum Zeitpunkt 0 zu einem Anstieg des TNF α -Gehalts und danach zu einem Abfall.

Anschließend kommt es bei beiden Gruppen zu einem Abfall des TNF α unterhalb des Ausgangswertes und steigt nach der Implantation zur Woche 6 wieder an. Dieser Anstieg fällt nicht so hoch aus, wie der erste zu Woche 1.

Bei Gruppe 1 (biphasische Konstrukte) wird das Maximum früher bei Woche 8 (112,70 +/- 123,40 ng/ml) erreicht. Bei der zweiten Gruppe (OATS-

Zylinder) wird das Maximum später zur Woche 12 (109,30+/-160,04 ng/ml) erreicht.

Tab. 25: Ergebnisse des TNF α -Gehalt (ng/ml) der Synovialflüssigkeit vor und nach Implantation biphasischer Konstrukte und Transplantation von OATS-Zylindern mit p-Wert des Mann-Whitney U-Tests. Beide Gruppen verhalten sich im Verlauf gleichläufig, mit einem ersten Maximum zum Zeitpunkt 1. Ein weiteres Maximum wird nach der Therapie zu Zeitpunkt 8 oder 12 erreicht.

Zytokine TNF alpha (ng/ml)					
Zeitpunkt (Wochen)	Mittelwert Therapie 1	Standard- abweichung	Mittelwert Therapie 2	Standard- abweichung	P-Wert
0	39,89	38,99	36,60	13,63	0,35
1	180,21	169,19	140,09	63,59	0,96
3	106,84	47,79	100,80	72,28	0,60
6	27,58	9,07	31,03	22,05	0,74
8	112,70	123,40	106,56	94,34	0,87
12	42,63	32,36	109,30	160,04	1,00
30	41,70	-	-	-	-
54	-	-	-	-	-

3.4. IL-6 Therapie 1 und Therapie 2

Zu beiden Therapiegruppen konnten keine Messwerte ermittelt werden.

4. Matrixmetalloproteinasen

4.1. MMP Therapie 1

Hier werden die Ergebnisse der Matrixmetalloproteinasen in der Synovialflüssigkeit in $\mu\text{g/ml}$ vor und nach der Implantation von biphasischen Knorpelkonstrukten beschrieben.

Der Ausgangswert der MMP liegt bei einem Mittelwert von 0,32+/- 0,17 $\mu\text{g/ml}$.

Nach der Defektsetzung zum Zeitpunkt 0 steigen die Werte zur Woche 1 (0,73+/-1,06 $\mu\text{g/ml}$) leicht an. Dann sinken die Werte wieder ab und liegen zur Implantation bei Woche 6 (0,53+/-0,59 $\mu\text{g/ml}$) etwas über dem Ausgangswert.

Sinken dann aber zur Woche 8 (0,32±0,24 µg/ml) und Woche 12 (0,31±0,20 µg/ml) auf den Ausgangswert zurück.

Zum Zeitpunkt 30 gibt es einen gewaltigen Anstieg auf 4,52±0,94 µg/ml.

Zuletzt liegt der Wert zu Woche 54 (0,42±0,25 µg/ml) leicht über dem Ausgangswert.

Tab. 26: Ergebnisse der Matrixmetalloproteinasen (µg/ml) der Synovialflüssigkeit vor und nach Implantation biphasischer Konstrukte. Nach der Defektsetzung kommt es zu einem geringen Anstieg zum Zeitpunkt 1. Erst nach der Implantation zur Woche 30 zeigt sich ein Maximum.

MMPs Therapie 1						
Zeitpunkt (Wochen)	Anzahl	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler	Minimum	Maximum
0	10	0,32	0,17	0,05	0,17	0,70
1	9	0,73	1,06	0,35	0,17	3,48
3	5	0,42	0,35	0,16	0,17	0,86
6	8	0,53	0,59	0,21	0,17	1,97
8	9	0,32	0,24	0,08	0	1
12	6	0,31	0,20	0,08	0,17	0,70
30	4	4,52	0,94	0,47	3,62	5,69
54	5	0,42	0,25	0,11	0,17	0,70

Die Werte zum Zeitpunkt 30 unterscheiden sich signifikant vom Ausgangswert, bei $p < 0,05$ bei Betrachtung des MMP-Gehalts bei Therapie 1.

Tab. 27: Vergleich der Ergebnisse der Matrixmetalloproteinasen der Synovialflüssigkeit nach Implantation biphasischer Konstrukte, im Vergleich zum Ausgangswert. Nur der enorme Anstieg der MMP zum Zeitpunkt 30 unterscheidet sich signifikant vom Ausgangswert.

Therapie 1 MMPs	
Vergleich der Zeitpunkte (Wochen)	P
0 zu 1	0,4138
0 zu 3	0,7133
0 zu 6	0,3066
0 zu 8	0,8702
0 zu 12	1,0000
0 zu 30	0,0047
0 zu 54	0,5812

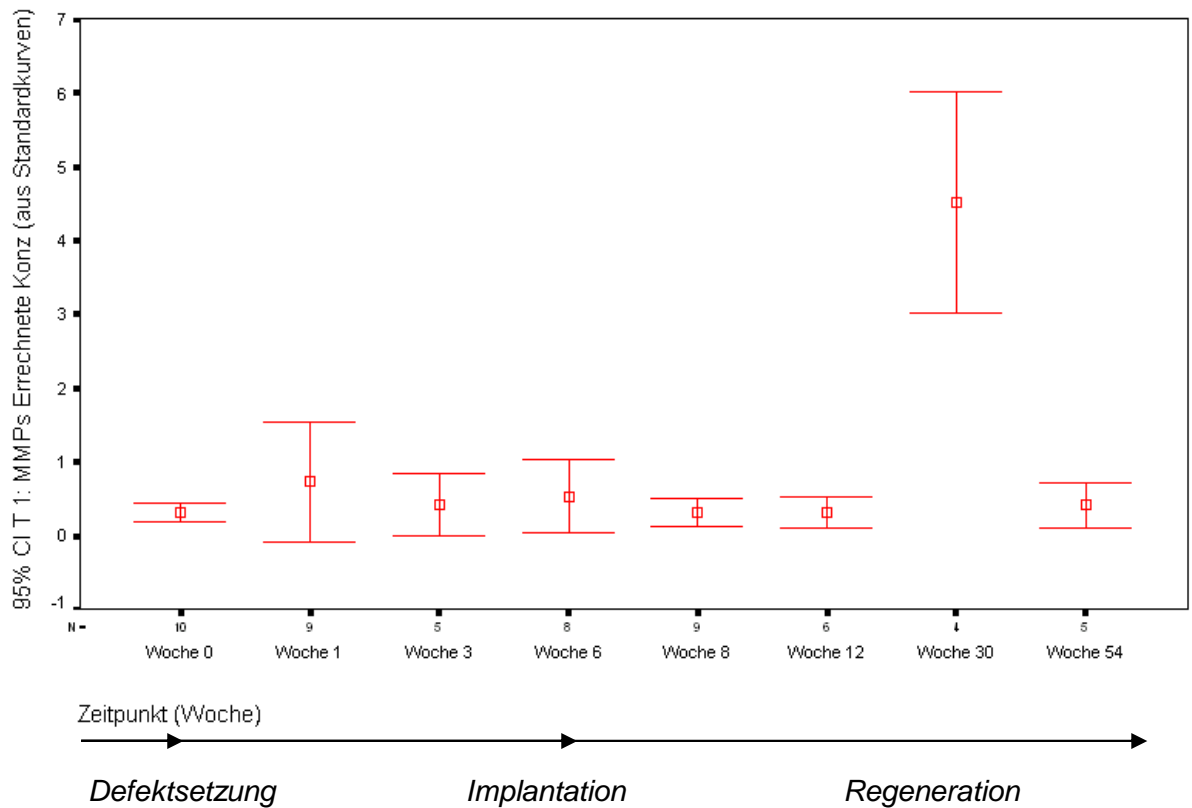


Abb. 18: Darstellung von Mittelwerten mit einem Konfidenzintervall von 95% der Matrixmetalloproteinasen in ($\mu\text{g/ml}$) der Synovialflüssigkeit vor und nach Implantation biphasischer Konstrukte gegen die Zeit in Wochen. Nach der Defektsetzung kommt es zu einem geringen Anstieg zum Zeitpunkt 1. Erst nach der Implantation zur Woche 30 zeigt sich ein Maximum.

4.2. MMP Therapie 2

Hier werden die Ergebnisse der Matrixmetalloproteinasen in der Synovialflüssigkeit in $\mu\text{g/ml}$ vor und nach der Transplantation von OATS-Zylindern beschrieben.

Der Ausgangswert der MMP liegt bei einem Mittelwert von $0,30 \pm 0,11 \mu\text{g/ml}$.

Nach der Defektsetzung zum Zeitpunkt 0 steigen die Werte zur Woche 1 ($0,42 \pm 0,29 \mu\text{g/ml}$) leicht an. Zur Implantation bei Woche 6 ($0,39 \pm 0,19 \mu\text{g/ml}$) sind die Werte etwas über dem Ausgangswert und verbleiben auf diesem Niveau. Bis es bei Woche 30 ($3,03 \pm 1,41 \mu\text{g/ml}$) einen gewaltigen Anstieg auf das Maximum gibt. Zu Woche 54 ($2,57 \pm 4,51 \mu\text{g/ml}$) gibt es ein leichtes Absinken, jedoch liegen die Werte weit über dem Ausgangswert.

Tab. 28: Ergebnisse der Matrixmetalloproteinasen ($\mu\text{g/ml}$) der Synovialflüssigkeit vor und nach der Transplantation von OATS Zylindern. Nach der Defektsetzung kommt es zu einem geringen Anstieg zum Zeitpunkt 1. Erst nach der Implantation zur Woche 30 zeigt sich ein Maximum. Zum Zeitpunkt 54 sind die Werte noch erhöht.

MMPs Therapie 2						
Zeitpunkt (Wochen)	Anzahl	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler	Minimum	Maximum
0	10	0,30	0,11	0,03	0,17	0,50
1	7	0,42	0,29	0,11	0,17	0,89
3	3	0,42	0,31	0,18	0,19	0,77
6	8	0,39	0,19	0,07	0,22	0,81
8	9	0,39	0,27	0,09	0	1
12	5	0,39	0,24	0,11	0,17	0,80
30	5	3,03	1,41	0,63	1,03	5,01
54	5	2,57	4,51	2,02	0,18	10,64

Der Zeitpunkt 30 unterscheidet sich signifikant vom Ausgangswert, bei $p < 0,05$ bei Betrachtung des MMP-Gehalt zum Ausgangswert bei Therapie 2.

Tab. 29: Vergleich der Ergebnisse der Matrixmetalloproteinasen der Synovialflüssigkeit nach Transplantation von OATS Zylindern, im Vergleich zum Ausgangswert. Nur Zeitpunkt 30 unterscheidet sich signifikant vom Ausgangswert.

Therapie 2 MMPs	
Vergleich der Zeitpunkte (Wochen)	P
0 zu 1	0,5582
0 zu 3	0,6121
0 zu 6	0,2135
0 zu 8	0,6242
0 zu 12	0,3913
0 zu 30	0,0022
0 zu 54	0,0500

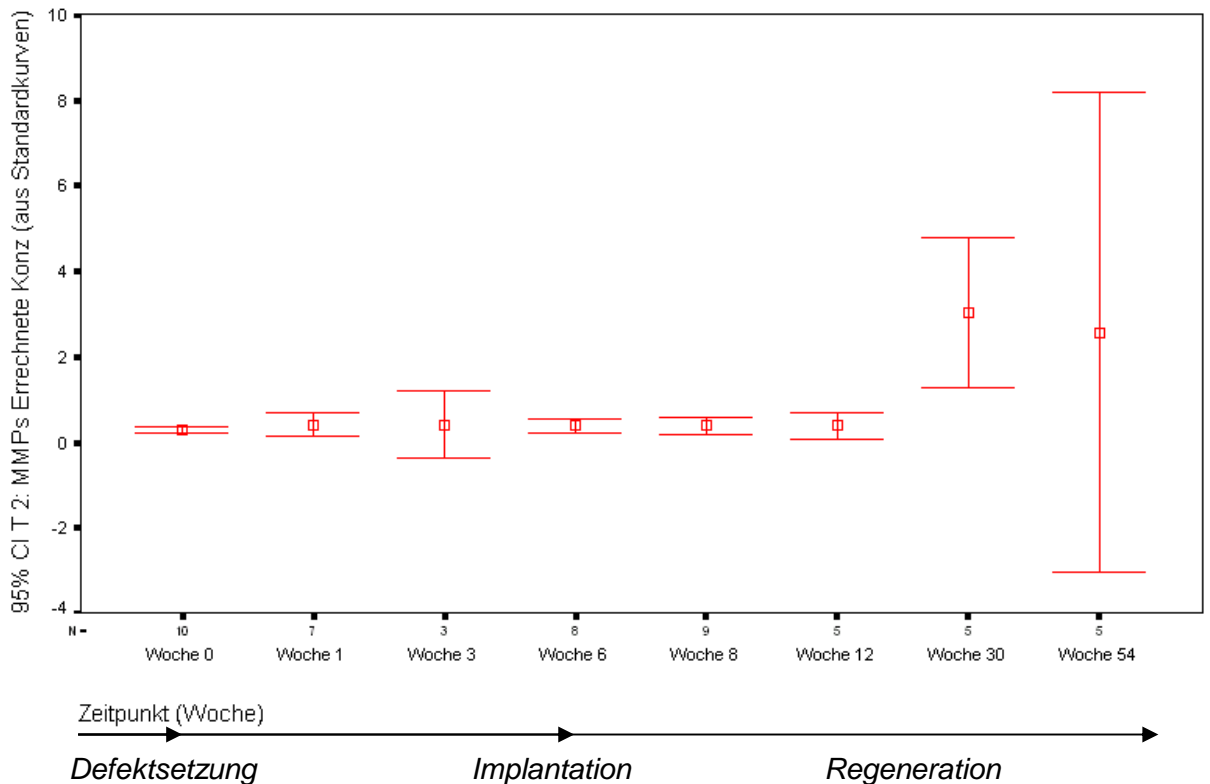


Abb. 19: Darstellung von Mittelwerten mit einem Konfidenzintervall von 95% der Matrixmetalloproteinase in ($\mu\text{g/ml}$) der Synovialflüssigkeit vor und nach Transplantation von OATS-Zylindern gegen die Zeit in Wochen. Nach der Defektsetzung kommt es zu einem geringen Anstieg zum Zeitpunkt 1. Erst nach der Implantation zur Woche 30 zeigt sich ein Maximum. Zum Zeitpunkt 54 sind die Werte noch erhöht.

4.3. Vergleich MMP

Bei beiden Therapiegruppen liegt ein etwa gleicher Ausgangswert zum Zeitpunkt 0 vor (Gruppe 1: $0,32 \pm 0,17 \mu\text{g/ml}$; Gruppe 2: $0,30 \pm 0,11 \mu\text{g/ml}$). Hier unterscheiden sich die beiden Gruppen mit $p=0,94$ nicht signifikant voneinander.

Danach steigt bei beiden Gruppen nach der Defektsetzung der MMP-Gehalt etwas zur Woche 1 an. Auch hier gibt es mit $p=0,71$ keinen signifikanten Unterschied. Bei beiden Gruppen liegt der Wert zur Implantation zum Zeitpunkt 6 über dem Ausgangswert (Gruppe 1: $0,53 \pm 0,59 \mu\text{g/ml}$; Gruppe 2: $0,39 \pm 0,19 \mu\text{g/ml}$).

Bei beiden Gruppen kommt es zu einem enormen signifikanten Anstieg des MMP-Gehalts in der Synovialflüssigkeit mit Erreichen des Maximums bei Woche 30.

Bei der ersten Gruppe (biphasische Konstrukte) liegt der Wert bei Woche 30 bei $4,52 \pm 0,94 \mu\text{g/ml}$. Mit einem von $p=0,09$ jedoch nicht signifikant höher als zur zweiten Gruppe bei Woche 30 ($3,03 \pm 1,41 \mu\text{g/ml}$).

In der ersten Gruppe sinken die Werte schneller ab und liegen bei Woche 54 mit $0,42 \pm 0,23 \mu\text{g/ml}$ nahe dem Ausgangswert. Mit $p=0,25$ gibt es keinen signifikanten Unterschied zu Gruppe 2. Diese ist mit einem Wert von $2,57 \pm 4,51 \mu\text{g/ml}$ zur Woche 54 auch abgefallen, weist aber eine hohe Streuung der Werte auf. Hier liegen die Werte weit über dem Ausgangswert.

Insgesamt gibt es für beide Gruppen bei $p>0,05$ keinen signifikanten Unterschied zueinander zu allen Zeitpunkten.

Tab. 30: Ergebnisse des MMP-Gehalts der Synovialflüssigkeit vor und nach Implantation biphasischer Konstrukte und Transplantation von OATS-Zylindern mit p-Wert des Mann-Whitney U-Tests. Beide Gruppen zeigen gleichläufige Werte, ohne einen signifikanten Unterschied zueinander.

MMPs ($\mu\text{g/ml}$)					
Zeitpunkt (Wochen)	Mittelwert Therapie 1	Standard- abweichung	Mittelwert Therapie 2	Standard- abweichung	P-Wert
0	0,32	0,17	0,30	0,11	0,94
1	0,73	1,06	0,42	0,29	0,71
3	0,42	0,35	0,42	0,31	0,46
6	0,53	0,59	0,39	0,19	0,92
8	0,32	0,24	0,39	0,27	0,63
12	0,31	0,20	0,39	0,24	0,36
30	4,52	0,94	3,03	1,41	0,09
54	0,42	0,25	2,57	4,51	0,25

5. Glykosaminoglykane

5.1. GAG Therapie 1

Es werden die Ergebnisse der Glykosaminoglykane in der Synovialflüssigkeit in mg/l vor und nach der Implantation von biphasischen Knorpelkonstrukten beschrieben.

Der Ausgangswert der Glykosaminoglykane liegt bei einem Mittelwert von $5,2 \pm 2,62 \text{ mg/l}$.

Nach der Defektsetzung zum Zeitpunkt 0 sinken die Werte immer weiter ab und liegen zur Implantation zur Woche 6 bei $1,04 \pm 0,77 \text{ mg/l}$ unterhalb des

Ausgangswertes. Danach beginnen die Werte wieder zu steigen und erreichen bei Woche 30 mit 9,69 \pm 1,89 mg/l ein Maximum, das weit über dem Ausgangswert liegt. Danach beginnen die Werte erneut zu fallen und liegen bei der letzten Messung zum Zeitpunkt 54 mit 7,71 \pm 1,73 mg/l immer noch über dem Ausgangswert.

Tab. 31: Ergebnisse der Glykosaminoglykane (mg/l) der Synovialflüssigkeit vor und nach Implantation biphasischer Konstrukte. Nach Defektsetzung sinken die Werte und erreichen ein Minimum zur Implantation in Woche 6. Danach steigen die Werte und erreichen ein Maximum zu Woche 30.

Glykosamino- glykane (mg/l) Therapie 1						
Zeitpunkt (Wochen)	Anzahl	Mittelwert	Standard- abweichung	Standard- fehler	Minimum	Maximum
0	9	5,20	2,63	0,88	2,15	9,13
1	8	2,42	1,45	0,51	0,46	4,78
3	5	2,37	1,87	0,84	0,46	5,09
6	6	1,04	0,77	0,32	0,20	2,27
8	7	1,20	1,42	0,54	0	3
12	6	3,17	2,41	0,98	0,42	5,57
30	4	9,69	1,89	0,94	8,52	12,51
54	4	7,71	1,73	0,87	5,53	9,61

Die Zeitpunkte 1, 6, 8 und 30 Wochen unterscheiden sich signifikant vom Ausgangswert, bei $p < 0,05$ bei Betrachtung des GAG-Gehalt bei Therapie 1.

Tab. 32: Vergleich der Ergebnisse der Glykosaminoglykane des Synoviapunktates nach Implantation biphasischer Konstrukte, im Vergleich zum Ausgangswert. Das Minimum zu Woche 6 und das Maximum nach der Implantation zu Woche 30 unterscheiden sich signifikant zum Ausgangswert.

Therapie 1 GAG	
Vergleich der Zeitpunkte (Wochen)	p
0 zu 1	0,0433
0 zu 3	0,0532
0 zu 6	0,0022
0 zu 8	0,0070
0 zu 12	0,1949
0 zu 30	0,0206
0 zu 54	0,1228

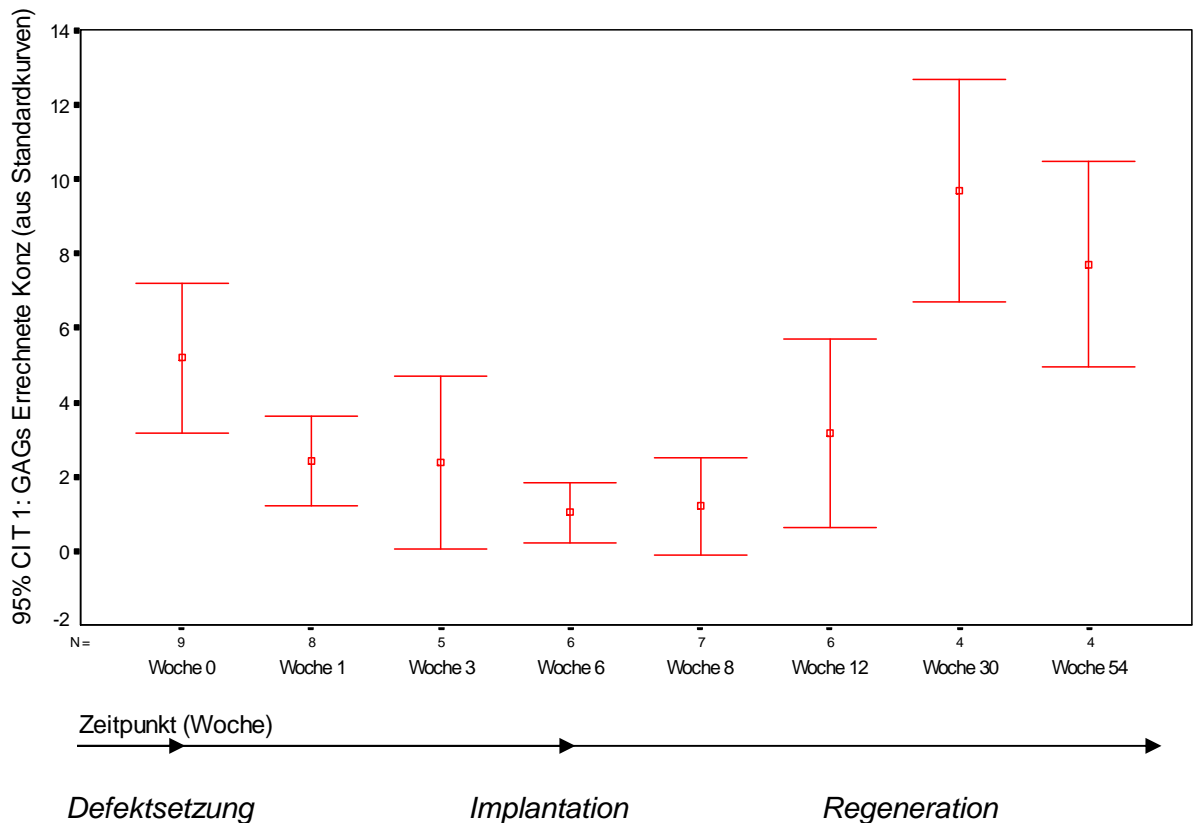


Abb. 20: Darstellung von Mittelwerten mit einem Konfidenzintervall von 95% der Glykosaminoglykane in (mg/l) der Synovialflüssigkeit vor und nach Implantation biphasischer Konstrukte gegen die Zeit in Wochen. Nach Defektsetzung sinken die Werte und erreichen ein Minimum zur Implantation in Woche 6. Danach Steigen die Werte und erreichen ein Maximum zu Woche 30.

5.2. GAG Therapie 2

Hier werden die Glykosaminoglykane in der Synovialflüssigkeit in mg/l vor und nach der Transplantation von OATS-Zylindern beschrieben.

Der Ausgangswert der GAG liegt hier etwas höher bei einem Mittelwert von 7,47+/- 2,06 mg/l.

Auch hier sinkt nach der Defektsetzung zum Zeitpunkt 0 der Gehalt ab und erreicht bei Woche 3 mit 0,82+/-0,33 mg/l ein Minimum.

Zur Transplantation bei Woche 6 liegen die Werte mit 1,94+/-1,45 mg/l unterhalb des Ausgangswertes. Danach schwanken sie auf einem

niedrigen Niveau und steigen dann auch hier zu einem Maximum bei Woche 30 mit 8,76+/-3,51 mg/l an. Dann sinken die Werte zur letzten Messung bei Woche 54 (7,6+/-2,41 mg/l) wieder ab und liegen knapp über dem Ausgangswert.

Tab. 33: Ergebnisse der Glykosaminoglykane (mg/l) der Synovialflüssigkeit vor und nach Transplantation von OATS-Zylindern. Nach Defektsetzung sinken die Werte ab und erreichen ein Minimum zur Woche 3. Nach der Implantation Steigen die Werte und erreichen ein Maximum zu Woche 30.

Glykosamino- glykane (mg/l) Therapie 2						
Zeitpunkt (Wochen)	Anzahl	Mittelwert	Standard- abweichung	Standard- fehler	Minimum	Maximum
0	10	7,47	2,06	0,65	5,23	11,30
1	8	2,44	1,14	0,40	1,09	3,82
3	3	0,82	0,33	0,19	,53	1,17
6	8	1,94	1,45	0,51	0,49	4,46
8	9	1,36	1,27	0,42	0	4
12	4	0,58	0,17	0,09	0,38	0,80
30	5	8,76	3,51	1,57	3,17	11,86
54	3	7,60	2,41	1,39	4,83	9,19

Die Zeitpunkte 1, 3, 6, 8 und 12 Wochen unterscheiden sich signifikant vom Ausgangswert bei $p < 0,05$ unter Betrachtung des GAG-Gehalts.

Tab. 34: Vergleich der Ergebnisse der der Glykosaminoglykane (mg/l) der Synovialflüssigkeit nach Transplantation von OATS Zylindern, im Vergleich zum Ausgangswert. Das Minimum zur Woche 3 unterscheidet sich signifikant vom Ausgangswert.

Therapie 2 GAG	
Vergleich der Zeitpunkte (Wochen)	p
0 zu 1	0,0004
0 zu 3	0,0112
0 zu 6	0,0004
0 zu 8	0,0002
0 zu 12	0,0047
0 zu 30	0,2703
0 zu 54	1,0000

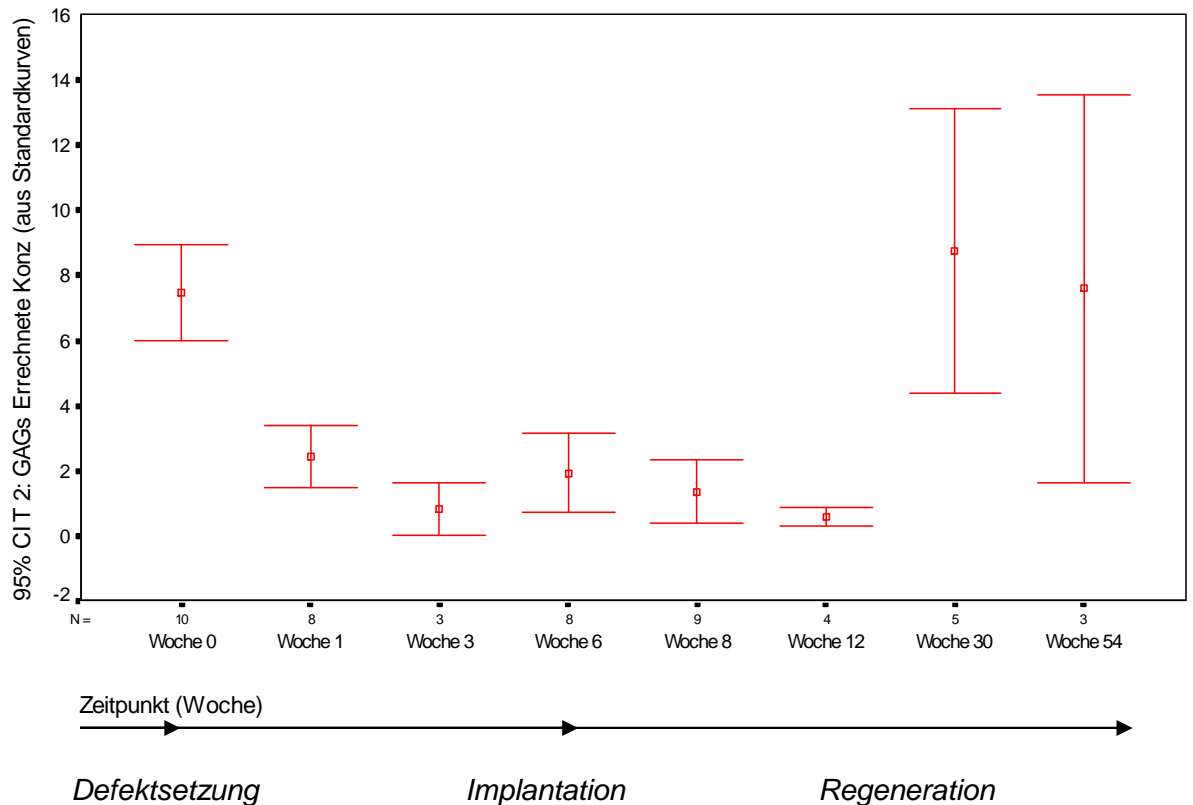


Abb. 21: Darstellung von Mittelwerten mit einem Konfidenzintervall von 95% der Glykosaminoglykane in (mg/l) der Synovialflüssigkeit vor und nach Transplantation von OATS-Zylindern gegen die Zeit in Wochen. Nach Defektsetzung sinken die Werte ab und erreichen ein Minimum zur Woche 3. Nach der Implantation steigen die Werte und erreichen ein Maximum zu Woche 30.

5.3. Vergleich GAG

Hier unterscheiden sich beide Gruppen in ihrem Ausgangswert, mit einem p-Wert von 0,09, jedoch nicht signifikant. Bei der Gruppe 1 (biphasische Konstrukte) liegt er zum Zeitpunkt 0 mit $5,2 \pm 2,63$ mg/l unter der Gruppe 2 (OATS-Zylinder) mit $7,47 \pm 2,06$ mg/l.

Nach der Defektsetzung (Zeitpunkt 0) sinkt bei beiden Gruppen der GAG-Gehalt in der Synovialflüssigkeit unter den Ausgangswert ab und verbleibt dort auch zur Implantation bei Woche 6.

Danach steigen die Werte wieder an und erreichen bei beiden Gruppen ein Maximum zur Woche 30. Wobei bei der ersten Gruppe dieser Anstieg deutlicher ausfällt.

Danach sinken die Werte wieder ab und sind bei beiden Gruppen zur letzten Messung bei Woche 54 über dem Ausgangswert.

Insgesamt gibt es für beide Gruppen bei $p > 0,05$ keinen signifikanten Unterschied zu allen Zeitpunkten zueinander.

Tab. 35: Ergebnisse der Glykosaminoglykane in (mg/l) der Synovialflüssigkeit vor und nach Implantation biphasischer Konstrukte und Transplantation von OATS-Zylindern mit p-Wert des Mann-Whitney U-Tests. Beide Gruppen verhalten sich gleich, ohne signifikantem Unterschied zueinander.

Glykosamino- glykane (mg/l)					
Zeitpunkt (Wochen)	Mittelwert Therapie 1	Standard- abweichung	Mittelwert Therapie 2	Standard- abweichung	P-Wert
0	5,20	2,63	7,47	2,06	0,09
1	2,42	1,45	2,44	1,14	0,83
3	2,37	1,87	0,82	0,33	0,29
6	1,04	0,77	1,94	1,45	0,24
8	1,20	1,42	1,36	1,27	0,71
12	3,17	2,41	0,58	0,17	0,20
30	9,69	1,89	8,76	3,51	0,81
54	7,71	1,73	7,60	2,41	1,00

6. Zusammenfassung der Ergebnisse

Beide Therapiegruppen zeigen einen sehr ähnlichen Verlauf der Marker. Es gibt nur wenige Zeitpunkte, an denen sich beide Gruppen signifikant voneinander unterscheiden.

So kommt es bei allen Markern zu einer Veränderung nach den Operationen zum Zeitpunkt der Defektsetzung (Zeitpunkt 0) und der Implantation (Zeitpunkt 6).

Hierbei erfolgt ein signifikanter Anstieg der Zellzahl, der Lymphozyten, der Monozyten, der Granulozyten, des TNF α und der MMP. Alle diese Marker zeigen ein erstes Maximum eine Woche nach der Defektsetzung (Zeitpunkt 1).

Nach der operativen Knorpeltherapie kommt es zu einem erneuten Anstieg

dieser Parameter, jedoch zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

Zellzahl, Granulozyten und das TNF α erreichen einen zweiten Gipfel zum Zeitpunkt 8 (2 Wochen nach Defektbehandlung) bei Therapiegruppe 1 und zum Zeitpunkt 12 (6 Wochen nach Defektbehandlung) bei Therapiegruppe 2 an.

Die Lymphozyten und Monozyten zeigen bei Therapiegruppe 1 ihr zweites Maximum zum Zeitpunkt 54, also ein Jahr nach der Behandlung. Bei Therapiegruppe 2 steigen die Lymphozyten zum Zeitpunkt 12 an. Die Monozyten verbleiben in dieser Gruppe unterhalb des Ausgangswertes.

Die MMP steigen bei beiden Gruppen erst verspätet 6 Wochen nach Defektbehandlung und zeigen erst zur Woche 30 ein Maximum.

Die GAG verhalten sich im umgekehrten Sinne. Sie fallen nach der Defektsetzung in beiden Gruppen signifikant ab und weisen den niedrigsten Wert eine Woche nach der Defektsetzung (Zeitpunkt 1) auf. Sie liegen zur Implantation noch signifikant unterhalb des Ausgangswertes. Nach der zweiten Operation sinken sie erneut leicht ab und steigen erst später zur Woche 30 (24 Wochen nach Defektbehandlung) zu einem Höchstwert über dem initialen Ausgangswert vor der ersten Operation an. Bis zum Ende der Erfassung, in der Woche 54, verbleibt der Wert dann immer noch leicht über dem Ausgangswert.

Bei den Messungen zum letzten Zeitpunkt weisen alleine die Lymphozyten, Monozyten und GAG noch eine leichte Erhöhung über den Ausgangswert auf. Alle anderen Parameter erreichen wieder Werte nahe den Ausgangswerten. Keine Marker unterscheidet sich zum Zeitpunkt 54 signifikant vom Ausgangswert.

VI. DISKUSSION

Bisherige Studien für die Beurteilung von operativen Knorpelbehandlungen befassen sich vor allem mit klinischen und radiologischen Befunden. Vereinzelt kommen auch Kontrollarthroskopien mit histologischen Untersuchungen zur Anwendung [37–40].

Es gibt wenige Kenntnisse über den Gelenkstoffwechsel nach operativen Knorpelbehandlungen und noch keine standardisierten Marker zur Messung und Prognose in der Nachuntersuchung fokaler Knorpelschäden.

Ziel dieser experimentellen Studie ist die Analyse synovialer Veränderungen im Rahmen der Therapie fokaler osteochondraler Defekte im Großtier durch autologe Knorpelknochen-Zylinder und stammzellbasierte biphasische Konstrukte.

Von besonderem Interesse ist dabei:

- der Zeitpunkt der Defektbehandlung bei einem chronischen Knorpeldefektmodell
- der zeitliche Verlauf der bestimmten synovialen Marker
- mögliche Unterschiede zwischen beiden Therapieoptionen

Diesbezüglich hypothetisieren wir zum einen synoviale Normbedingungen zum Zeitpunkt der Defektbehandlung durch den zeitlichen Abstand von 6 Wochen zur Defektsetzung.

Zum anderen einen stärkeren Anstieg knorpelabbauender Enzyme (MMP), Knorpelabbauprodukte (GAG) und Entzündungsmarker (Zellzahl und TNF- α) im zeitlichen Verlauf bei der biphasischen Gruppe verglichen zur OATS-Gruppe.

Unsere Ergebnisse bestätigten den ersten Teil unserer Hypothese. So konnte gezeigt werden, dass zum Zeitpunkt der Implantation sowohl die Zellzahl, die Lymphozyten, die Granulozyten, das TNF α , als auch die MMP auf das Ausgangsniveau der ersten Operation zurückgekehrt sind. Somit fand sich bei diesen Markern zum Zeitpunkt der Implantation (6 Wochen)

kein signifikanter Unterschied zum Ausgangswert. Lediglich der Glykosaminoglykan-Gehalt der Synovialflüssigkeit und die Monozytenfraktion beider Gruppen lagen signifikant unterhalb des Ausgangswertes. Dies lässt dann auf einen verminderten Knorpelabbau oder Umbau schließen. Was das gewählte Defektmodell dahingehend bestätigt, dass nicht in eine akute inflammatorische Situation implantiert wurde, sondern der zeitliche Abstand von 6 Wochen ausreichend ist, die akute inflammatorische Reaktion der Erstoperation abklingen zu lassen.

In Bezug auf den zweiten Teil der formulierten Hypothese sehen wir uns nicht bestätigt. Beide Gruppen verhielten sich im zeitlichen Verlauf der Marker gleichläufig. Somit zeigten sich bei der Zellzahl, dem TNF- α , den MMP und den GAG keine signifikanten Unterschiede der Werte beider Gruppen zu den einzelnen Zeitpunkten zueinander.

Es gibt lediglich einen signifikanten Unterschied des Ausgangswertes der Lymphozyten beider Gruppen. Dieser Unterschied kann mit der hohen interindividuellen Varianz der Werte und der geringen Stichprobenzahl zusammenhängen.

Dadurch lässt sich kein klarer Unterschied der Marker im zeitlichen Verlauf beider Therapiegruppen erkennen.

Unabhängig von der Therapie verändern sich alle Knorpelmarker nach den Operationen zur Defektsetzung und zur Implantation.

Dabei steigen Zellzahl, die Lymphozyten, die Monozyten, die Granulozyten, das TNF α und die MMP in ihrem Gehalt in der Synovialflüssigkeit an. Diese Marker zeigen ein erstes Maximum direkt eine Woche nach der Defektsetzung (Woche 1). Es kommt zu einem zweiten Maximum zwei bis vier Wochen nach der Implantation (Woche 8 und 12) bei beiden Therapiegruppen.

Dabei kommt es bei den MMP nur zu einem geringem ersten und erst später zu einem weitaus höherem zweiten Maximum zur Woche 30. Dies kann unter anderem an einer verspäteten Reaktion der MMP durch eine vermehrte Genexpression ausgelöst durch den Anstieg der TNF- α zu Woche 8 bis 12 liegen [2].

Alleine die GAG sinken direkt nach den Operationen ab und steigen erst spät (Woche 30) über ein Niveau über dem Ausgangswert an. Auch dies kann durch die erst verspätete Reaktion der MMP liegen.

Zu den letzten Messungen zeigen alleine die Lymphozyten und Monozyten der Therapiegruppe 1 eine leichte Erhöhung über den Ausgangswert. Diese sind jedoch nicht signifikant. Die restlichen Knorpelmarker erreichen wieder Werte nahe den Ausgangswerten.

In den nachfolgenden Kapiteln werden die Methodik und die Ergebnisse einzeln diskutiert.

1. Material und Methodik

1.1. Probenentnahme

Bei der Punktion von Kniegelenken wird bei den meisten Studien eine Spülung des Gelenks vorgenommen. Bei Messungen einer Gelenklavage kann sich durch die unkontrollierte Probenverdünnung ein signifikanter Fehler bei den Konzentrationen der Marker ergeben [41].

Bei unseren Versuchen wurde die Synovialflüssigkeit direkt bei den Operationen oder zwischenzeitlich durch sterile Punktionen des Kniegelenks gewonnen. Dabei wurde die Synovialflüssigkeit direkt entnommen und nicht das Kniegelenk gespült. Hierbei ergab sich gelegentlich das Problem, dass nur wenig Synovialflüssigkeit gewonnen werden konnte oder nicht genug Flüssigkeit zur Bestimmung aller Parameter zur Verfügung stand.

Mit einer Spülung des Kniegelenkes mit einer definierten Menge an Spülflüssigkeit wäre dieses Problem zu beheben gewesen. Jedoch sollte es nicht zu einer homogenen Vermengung von Synovialflüssigkeit und Spülflüssigkeit kommen, so verfälscht dies die Konzentration der Parameter. Des Weiteren käme es somit zu einer großen Verdünnung und eventuell lägen dann die Konzentrationen der Parameter unterhalb der Nachweisgrenze.

Zudem ist es wichtig, die gewonnen Proben schnellstmöglich zu

portionieren und zu kryokonservieren. So haben Studien gezeigt, dass bei einer längeren Lagerzeit bei Raumtemperatur sich die Ergebnisse verfälschen [42].

2. Ergebnisse

2.1. Knorpelmarker

Die Analyse von synovialen Knorpelmarkern erscheint eine Möglichkeit zur objektiven Beurteilung des Knorpelstoffwechsels und der Operativen Behandlung von Knorpeldefekten zu sein [4,8,12,41,43,44].

Leider gibt es zurzeit noch keinen Goldstandard zur Bestimmung und Quantifizierung von Knorpelschäden anhand von Biomarkern.

Unsere Studie betrachtet einige Knorpelmarker in der Synovialflüssigkeit im Verlauf nach zwei verschiedenen Therapien eines definierten osteochondralen Defektes genauer.

Hierbei ist jedoch nur eine deskriptive Untersuchung der Markerverläufe möglich. Genaue Werte lassen sich mit anderen Forschungsgruppen, durch variierende Nachweismethoden und zum Teil Forschung an unterschiedlichen Spezies nicht vergleichen. Ebenso gibt es kein standardisiertes Tiermodell, das es erlaubt Werte genau in Korrelation zu setzen. Es gibt bereits eine große interindividuelle Varianz bestimmter Marker [30]. Auch dadurch wird es schwierig genaue Werte für Marker festzulegen. Dies kann auch dazu führen, dass es zu einem Unterschied des Ausgangswertes zwischen zwei Gruppen führt. Somit ist nur das Verhalten eines Markers innerhalb einer Gruppe aussagekräftig und kann den Vergleich verschiedener Individuen und Gruppen schwierig machen.

3. Zellzahl

Die Untersuchung der Zellzahl in der Diagnostik von Gelenkserkrankungen ist mit einer der wichtigsten Parameter [45]. Nach Traumata und bei entzündlichen Gelenkserkrankungen kommt es zu einem Zellanstieg in der

Synovialflüssigkeit.

Bei beiden Gruppen kommt es zu einem Anstieg der Zellzahl in der Synovialflüssigkeit nach den Operationen zur Defektsetzung (Zeitpunkt 0) und der Therapie (Woche 6).

Dabei steigen die Werte bei Gruppe 1 und Gruppe 2 signifikant von Woche 0 zu Woche 1 an (Gruppe 1: $T_{01}=7,02\pm 15,6 \times 10^4/\text{ml}$ auf $T_{11}=64,40\pm 81,17 \times 10^4/\text{ml}$; Gruppe 2: $T_{02}=6,45\pm 13,09 \times 10^4/\text{ml}$ auf $T_{12}=34,76\pm 27,49 \times 10^4/\text{ml}$).

Danach fallen die Werte wieder auf nahezu den Ausgangswert ab.

Nach der Therapie zum Zeitpunkt 6 Wochen steigen die Werte erneut bei beiden Gruppen signifikant an. (Gruppe 1: $T_{61}=7,60\pm 12,45 \times 10^4/\text{ml}$ auf $T_{121}=18,61\pm 23,25 \times 10^4/\text{ml}$; Gruppe 2: $T_{62}=8,89\pm 14,49 \times 10^4/\text{ml}$ auf $T_{122}=38,83\pm 60,67 \times 10^4/\text{ml}$).

Anschließend fallen die Werte zur Woche 54 wieder annähernd auf den Ausgangswert zurück. Bei Gruppe 1 liegen die Werte sogar unterhalb des Ausgangswertes, jedoch nicht signifikant. Bei Gruppe 2 unterscheiden sich die Werte zu Woche 54 nicht signifikant vom Ausgangswert, sind aber noch leicht erhöht (Gruppe 1: $T_{541}=3,49\pm 4,73 \times 10^4/\text{ml}$; Gruppe 2: $T_{542}=7,26\pm 7,30 \times 10^4/\text{ml}$).

Es ist zu beobachten, dass es nach den operativen Eingriffen ein Anstieg der Zellzahl zu erkennen ist.

Im Langzeitverlauf sinken die Zellzahlen bei der Therapie mit biphasischen Konstrukten stärker ab, jedoch ist dies nicht signifikant nachzuweisen.

Beide Gruppen unterscheiden sich im Verlauf untereinander zu keinem Zeitpunkt signifikant, bei $p>0,05$.

Somit ist über die Zellzahl kein signifikanter Unterschied der beiden Therapien auszumachen. Auch im Langzeitverlauf ist keine persistierende Erhöhung der Zellzahl in der Synovialflüssigkeit zu erkennen. Bei einer Chronifizierung einer Entzündung wäre eine stetige Erhöhung der Zellzahl zum Ausgangswert zu erwarten.

Auch Studien haben gezeigt, dass bei länger anhaltender Arthrose es keinen Zusammenhang zwischen der Zellzahl der weißen Blutkörperchen in der Synovialflüssigkeit und der Dauer oder Schwere der Arthrose gibt [46].

Lediglich nach Operationen ist ein signifikanter Anstieg der weißen Blutkörperchen in der Synovialflüssigkeit zu erkennen. Dies scheint eine normale physiologische Reaktion zu sein und unabhängig von der Art der Therapie.

4. Zelldifferenzierung

Entzündungszellen spielen eine essenzielle Rolle in der Entstehung einer Arthrose [47]. In der normalen Zelldifferenzierung der Synovialflüssigkeit zeigen sich 50-65% Monozyten mit Neutrophilen und Lymphozyten, mit jeweils weniger als 25% der weißen Blutkörperchen. Mit einem Gehalt von mehr als 80% Neutrophilen ist von einer septischen Arthritis auszugehen. Höhere Lymphozyten zeigen eher eine rheumatoide Arthritis. Es wurde gezeigt, dass es bei einer Arthrose im Vergleich zu einem Trauma vermehrt zu einer Inflammation mit Entzündungszellen kommt [48].

In unserer Studie ist zu erkennen, dass alle Zelltypen nach einer Operation etwa homogen ansteigen. Damit folgen sie dem Trend der Gesamtzellzahl. Ein wesentlicher Unterschied zwischen beiden Therapiegruppen ist dabei nicht zu erkennen.

4.1. R1

R1 zeigt den Lymphozytenanteil, der mit der FACS Zelldifferenzierung, vor und nach der Therapie gemessen wurde.

Bei beiden Gruppen gibt es nach der Defektsetzung zum Zeitpunkt 0 einen enormen Anstieg der Lymphozyten (Gruppe 1: $T_{01}=188,40\pm 200,54$ /ml auf $T_{11}=2737,33\pm 3667,01$ /ml; Gruppe 2: $T_{02}=553,00\pm 441,65$ /ml auf $T_{12}=3128,63\pm 5215,11$ /ml).

Bei Gruppe 1 steigen die Werte nach der Defektsetzung zum Zeitpunkt 0 auf Woche 1 signifikant an. Bei Gruppe 2 steigen die Werte ebenfalls von Woche 0 auf Woche 1 an. Jedoch ist hier durch die große Streuung mit

$p=0,062$ keine Signifikanz festzustellen.

Ebenfalls unterscheiden sich die beiden Gruppen zum Zeitpunkt 1 nicht signifikant voneinander. Dies ist zu erwarten, da es zu diesem Zeitpunkt noch keinen Unterschied in der Behandlung beider Gruppen gibt.

Später sinken die Werte beider Gruppen unterhalb des Ausgangswertes zum Zeitpunkt der zweiten Operation zur Woche 6.

Danach steigen die Werte erneut an, jedoch nicht so ausgeprägt (Gruppe 1: $T6_1=182,64\pm 224,73$ /ml auf $T12_1=669,50\pm 863,50$ /ml und $T30_1=1425,80\pm 1587,63$ /ml; Gruppe 2: $T6_2=406,64\pm 475,32$ /ml auf $T12_2=1201,40\pm 1386,26$ /ml). Auch hier ist durch die große Streuung keine Signifikanz festzustellen.

Bei Gruppe 1 bleiben die Werte zur Woche 54 zum Ausgangswert erhöht, jedoch ist diese Erhöhung nicht signifikant ($T54_1=2845,40\pm 5748,83$ /ml).

Auch bei Gruppe 2 bleiben die Werte zur Woche 54 zum Ausgangswert erhöht, jedoch ist diese Erhöhung nicht so enorm und nicht signifikant zum Ausgangswert ($T54_2=707,40\pm 983,89$ /ml).

Bei der Lymphozytenzahl in der Synovialflüssigkeit ist zu beobachten, dass es nach beiden Operationen (Defektsetzung und Therapie) zu einem Anstieg bei beiden Gruppen kommt. Bei der Therapiegruppe mit biphasischen Konstrukten kommt es in der Langzeitbeobachtung zu einem etwas späteren Anstieg und die Werte bleiben bis 2 Jahre nach der Therapie zur Woche 54 immer noch erhöht. Jedoch ist durch die große Streuung der Werte kein signifikanter Unterschied vom Ausgangswert zum Zeitpunkt 54 zu messen.

Bei der OATS-Gruppe steigen die Werte etwas früher nach der Therapie an und sinken auch zum Zeitpunkt 54 wieder ab. Aber auch hier liegen die Werte noch leicht über dem Ausgangswert.

Beide Gruppen unterscheiden sich auch hier nur signifikant in ihrem Ausgangswert.

4.2. R2

R2 zeigt den Monozytenanteil, der mit der FACS Zelldifferenzierung vor und nach der Therapie gemessen wurde.

Beide Gruppen unterscheiden sich in ihren Monozytenwerten in ihrem Ausgangswert, jedoch nicht signifikant. Dabei ist ein höherer Ausgangswert bei Gruppe 2 (biphasische Konstrukte) zu beobachten. Dies kann auf eine interindividuelle Varianz zurückzuführen sein.

Auch die Monozyten steigen wie die Zellzahl nach den Operationen an, dieser ist aber nur bei Gruppe 1 signifikant (Gruppe 1: $T0_1=375,80\pm 353,60$ /ml auf $T1_1=4368,89\pm 5044,11$ /ml; Gruppe 2: $T0_2=1344,40\pm 1419,62$ /ml auf $T1_2=6215,13\pm 5950,43$ /ml).

Danach ist bei beiden Gruppen ein signifikanter Abfall der Monozyten vor der Therapie zum Zeitpunkt 3 und 6 zu beobachten. Somit liegt der Wert der Monozyten vor der Therapie signifikant unterhalb des Ausgangswertes. Nach der Therapie steigen bei beiden Gruppen die Werte erneut an (Gruppe 1: $T6_1=57,73\pm 69,78$ /ml auf $T8_1=768,22\pm 1335,61$ /ml; Gruppe 2: $T6_2=174,64\pm 115,47$ /ml auf $T8_2=429,78\pm 360,95$ /ml).

Bei Gruppe 1 kommt es bis zum Zeitpunkt 54 zu einem stetigen Anstieg, wobei aber nur die Woche 30 signifikant über dem Ausgangswert liegt ($T30_1=1877,80\pm 1270,68$ /ml; $T54_1=2083,80\pm 2924,85$ /ml).

Bei Gruppe 2 kommt es nur zu einem geringeren Anstieg, jedoch liegen alle Werte bis Woche 54 nicht signifikant unterhalb des Ausgangswertes ($T30_2=382,60\pm 243,28$ /ml; $T54_2=608,20\pm 520,72$ /ml).

Dabei liegt Gruppe 2 zur Woche 30 signifikant unterhalb der Gruppe 1.

Insgesamt zeigen beide Gruppen wie die Gesamtzellzahl einen Anstieg nach beiden Operationen. Gruppe 1 zeigt größere Schwankungen in den Werten und liegt im Langzeitverlauf weit über Gruppe 2.

Es ist kein wesentlicher Unterschied im Verlauf der Monozyten in der Synovialflüssigkeit beider Gruppen zu messen.

Auch hier folgt der Verlauf der Monozyten dem der Gesamtzellzahl. Diese scheinen physiologischerweise nach der Operationen zu steigen. Für

konkretere Aussagen müsste eine größere Gruppenszahl untersucht werden.

4.3. R3

R3 zeigt den Granulozytenanteil, der mit der FACS Zelldifferenzierung vor und nach der Therapie gemessen wurde.

Beide Gruppen zeigen einen signifikanten Anstieg der Granulozyten nach der Defektsetzung (Gruppe 1: $T0_1=192,20\pm 228,73$ /ml auf $T1_1=3033,89\pm 4322,11$ /ml; Gruppe 2: $T0_2=560,10\pm 1035,67$ /ml auf $T1_2=3012,13\pm 3304,95$ /ml).

Auch nach der Therapie steigen die Werte erneut an und liegen bei Gruppe 1 über denen von Gruppe 2, jedoch nicht signifikant. Dieser Anstieg ist jedoch nicht signifikant zum Ausgangswert (Gruppe 1: $T6_1=56,64\pm 38,54$ /ml auf $T8_1=2268,78\pm 5965,93$ /ml; Gruppe 2: $T6_2=199,45\pm 253,78$ /ml auf $T8_2=872,11\pm 662,61$ /ml).

Im Langzeitverlauf sinken bei beiden Gruppen die Granulozytenzahl unterhalb des Ausgangswertes, jedoch unterscheidet sich nur Woche 30 bei Gruppe 2 signifikant vom Ausgangswert (Gruppe 1: $T30_1=382,60\pm 243,28$ /ml und $T54_1=137,20\pm 90,23$ /ml; Gruppe 2: $T30_2=608,20\pm 520,72$ /ml und $T54_2=77,20\pm 55,55$ /ml).

Bei beiden Gruppen gibt es wie bei der Gesamtzellzahl einen Anstieg nach beiden Operationen (Defektsetzung und Therapie). Jedoch fällt der Anstieg nach der Therapie nicht so hoch aus.

Beide Gruppen unterscheiden sich nur signifikant in ihren Granulozytenwerten zum Zeitpunkt 6 zur Defektsetzung. Zu diesem Zeitpunkt gibt es noch keine Abweichung in der Behandlung der Tiere.

5. Zytokine

5.1. TNF α

Die Initiierung einer Knorpeldegeneration bei der Arthrose wird über Zytokine wie TNF α bewirkt [16]. TNF α bewirkt bei einer aktivierten Synovitis eine vermehrte Genexpression von MMP und somit eine Degradation des Knorpels [2,20–22]. So ist TNF α eines der wichtigsten

Zytokine bei der Entstehung von Knorpeldegeneration [15].

Bei unserer Studie war zu messen, dass es bei beiden Therapiegruppen nach der ersten Operation (Defektsetzung) zu einem signifikanten Anstieg des TNF α mit einem Maximum eine Woche nach der Operation kommt (Gruppe 1: $T_{01}=39,89\pm 38,99$ ng/ml auf $T_{11}=180,21\pm 169,19$ ng/ml; Gruppe 2: $T_{02}=36,60\pm 13,63$ ng/ml auf $T_{12}=140,09\pm 63,59$ ng/ml). Dies scheint eine Reaktion auf die Operation zu sein.

Danach sinken zum Zeitpunkt der zweiten Operation (Implantation der biphasischen Konstrukte und Transplantation der OATS-Zylinder) bei beiden Gruppen der TNF α -Gehalt auf den Ausgangswert zurück.

Dies zeigt, dass sich zum Zeitpunkt der Therapie keine vermehrte Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen vorliegt.

Nach der zweiten Operation steigt das TNF α bei beiden Gruppen erneut an. Dabei wird bei beiden Gruppen ein signifikant höherer TNF α -Gehalt zum Zeitpunkt 8 erreicht (Gruppe 1: $T_{61}=27,58\pm 9,07$ ng/ml auf $T_{81}=112,7\pm 123,4$ ng/ml; Gruppe 2: $T_{62}=31,03\pm 22,05$ ng/ml auf $T_{82}=106,56\pm 94,34$ ng/ml). Bei Gruppe 1 (biphasische Konstrukte) wird das Maximum früher bei T8 erreicht. Bei der zweiten Gruppe (OATS-Zylinder) wird das Maximum später zur Woche 12 ($109,30\pm 160,04$ ng/ml) erreicht.

30 Wochen nach der Therapie sinken die Werte wieder auf das Ausgangsniveau bei Gruppe 1. Jedoch gibt es hier nur einen Messwert, der eine verlässliche Auswertung nicht möglich macht. Zum Zeitpunkt 12 Wochen sind die Werte jedoch schon fast auf den Ausgangswert gesunken.

Dies lässt darauf schließen, dass es zu keiner Chronifizierung einer Entzündung gekommen ist. Für genauere Aussagen müssten erneute Messungen mit einer größeren Gruppengröße vorgenommen werden.

Bei Gruppe 2 sind die Werte zum Zeitpunkt 12 Wochen immer noch um das Dreifache des Ausgangswertes erhöht. Dies zeigt noch einen andauernden Entzündungsprozess. Jedoch konnte kein signifikanter Unterschied zum Ausgangswert nachgewiesen werden.

Leider liegen zu den Zeitpunkten 30 und 54 Wochen keine Messergebnisse

vor. Dies lässt eine Langzeitaussage nicht zu. Es sollten erneute Messungen zu späteren Zeitpunkten bei weiteren Studien vorgenommen werden.

Die Werte des TNF α zeigen wie die Zellzahl einen Anstieg nach beiden Operationen. Jedoch ist zu beobachten, dass nach der Therapie der Anstieg nicht mehr so enorm ausfällt, wie nach der Defektsetzung. Somit ist daraus zu schlussfolgern, dass eine vermehrte Ausschüttung von TNF α , eine physiologische Reaktion auf einen operativen Eingriff ist.

Studien haben gezeigt, dass der TNF α -Gehalt in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit Arthrose erhöht ist [49–57]. Es wurde gezeigt, dass der Gehalt an TNF α ein guter Indikator bei der Arthrose und Rheumatoiden Arthritis ist [58].

Swärd et al haben gezeigt, dass in der akuten Phase direkt nach einer Knieverletzung der Gehalt an TNF α signifikant erhöht ist [59]. Dies stimmt mit den Beobachtungen unserer Studie überein.

Bei unserer Studie konnten im Langzeitverlauf keine Messergebnisse, durch fehlende Proben gewonnen werden. Somit ist keine genaue Aussage über einen anhaltenden Knorpelabbau oder einer Entzündung zu treffen.

5.2. IL-6

Studien haben gezeigt, dass der der IL-6 Gehalt in der Synovialflüssigkeit von Tieren mit Arthrose erhöht ist [50,55,56]. Auch direkt nach Traumen ist der Gehalt an IL-6 erhöht [59].

Bei unserer Studie konnten jedoch keine Ergebnisse für IL-6 gewonnen werden.

Dies liegt eventuell an technischen Schwierigkeiten bei der Durchführung des ELISA-Kits oder daran, dass sich der IL-6 Gehalt unterhalb der Nachweisgrenze von 2,5 ng/ml lag. Aufgrund der nur begrenzten Proben konnte leider keine erneute Messung vorgenommen werden. Diese Tests sollten in folgenden Studien wiederholt werden.

6. Matrixmetalloproteinasen

Bei der Zerstörung des Gelenkknorpels spielen neben mechanischer

Belastung die Matrixmetalloproteinasen eine essenzielle Rolle [13,22,60,61].

Sie sind fähig die Extrazellulärematrix zu spalten. Zytokine wie IL-1 und TNF α , werden von aktivierten Synovialzellen oder dem Gelenkknorpel produziert und erhöhen signifikant die Genexpression von MMP [20].

Sie werden von Synovial- und Knorpelzellen synthetisiert [62] und sind nur in geringer Konzentration in der Gelenkflüssigkeit gesunder Individuen vorhanden.

Studien haben gezeigt, dass es bei Patienten nach einer Gelenksverletzung, bei einer Arthrose und entzündlichen Gelenkserkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis, zu einem Anstieg von MMP in der Gelenkflüssigkeit kommt [24,32,63–66].

Es wurde auch gezeigt, dass der Gehalt von MMP in der Gelenksflüssigkeit mit klinischen Scores, wie dem Outerbridge-Score, korrelieren kann [65]. Dabei gibt es eine Korrelation der MMP Aktivität zur Knorpelzerstörung [67]

In unserer Studie ist zu erkennen, dass es bei beiden Therapiegruppen zu einem geringen Anstieg der MMP in der Synovialflüssigkeit nach der Defektsetzung kommt (Gruppe 1 $T_{01}=0,32\pm 0,17$ $\mu\text{g/ml}$ auf $T_{11}=0,73\pm 1,06$ $\mu\text{g/ml}$; Gruppe 2: $T_{02}=0,30\pm 0,11$ $\mu\text{g/ml}$ auf $T_{12}=0,42\pm 0,29$ $\mu\text{g/ml}$). Dieser Anstieg ist jedoch zu den Ausgangswerten nicht signifikant.

Dies bestätigt die aktuelle Forschungsmeinung, dass nach Verletzungen des Knorpels oder entzündlichen Arthropathien vermehrt MMP gebildet werden [8,24,63,68].

Im weiteren Verlauf kommt es nach einer Therapie sowohl mit OATS-Zylindern, als auch mit biphasischen Konstrukten, zu einem enormen signifikanten Anstieg zum Zeitpunkt 30 Wochen (Gruppe 1: $T_{130}=4,52\pm 0,94$ $\mu\text{g/ml}$; Gruppe 2: $T_{302}=3,03\pm 1,41$ $\mu\text{g/ml}$). Somit kommt es 24 Wochen nach der Therapie bei beiden Gruppen zu Umbauprozessen am Knorpel. Dies kann im Zusammenhang mit der Integration der neuen Knorpelkonstrukte stehen. Aussagen anderer Forschungsgruppen zu diesem Verhalten konnten leider nicht gefunden werden.

Im längeren Verlauf sinken die MMP erst langsam wieder ab. Zum Zeitpunkt

54 Wochen liegen sie bei beiden Gruppen aber noch über dem Ausgangswert.

Es ist zu beobachten, dass die MMP wie andere Parameter einen Anstieg nach Operationen in der Synovialflüssigkeit zeigen. Jedoch ergeben sich hier erst größere Anstiege nach einer längeren Zeit. Daher sind die MMP eher als ein Langzeitmarker zu sehen.

Genauere Werte lassen sich mit anderen Forschungsgruppen durch variierende Nachweismethoden und zum Teil Forschung an unterschiedliche Spezies nicht vergleichen.

7. Glykosaminoglykane

GAG (Chondroitin-, Dermatan-, Heparan- und Keratansulfat) als Spaltprodukte von Proteoglykanen können bei Arthrose und Gelenkverletzungen als Marker der Synthese und Abbau des Knorpels dienen. So wurden in verschiedenen Studien von verschiedenen Untersuchern erhöhte Konzentrationen von GAG in der Synovialflüssigkeit nachgewiesen [29–32,59,69].

Bei unserer Studie unterscheiden sich beide Gruppen bereits in ihren Ausgangswerten. Zum Zeitpunkt 0 liegt bei Gruppe 1 der Ausgangswert unterhalb dem der Gruppe 2 (Gruppe 1: $T0_1=5,2\pm 2,63$ mg/l; Gruppe 2: $T0_2=7,47\pm 2,06$ mg/l). Dies zeigt die hohe interindividuelle Varianz der Versuchstiere. Diese hohe interindividuelle Varianz beobachten auch andere Gruppen [30].

Nach der Defektsetzung sinken die Werte bei Gruppe 1 signifikant innerhalb einer Woche zum Zeitpunkt 1 ab ($T0_1=5,2\pm 2,63$ mg/l; $T1_1=2,42\pm 1,45$ mg/l; $T3_1=2,37\pm 1,87$ mg/l).

Auch bei Gruppe 2 sinken die Werte nach der Defektsetzung zum Zeitpunkt 1 und 3 signifikant ab ($T0_2=7,47\pm 2,06$ mg/l auf $T1_2=2,44\pm 1,14$ mg/l und $T3_2=0,82\pm 0,33$ mg/l).

Bei Gruppe 1 liegen die Werte zum Zeitpunkt der Therapie noch signifikant unterhalb des Ausgangswertes ($T6_1=1,04\pm 0,77$ mg/l und $T8_1=1,20\pm 1,42$ mg/l).

Bei Gruppe 2 sinken die Werte nach der Therapie erneut signifikant zum Zeitpunkt 8 und 12 Wochen ab ($T6_2=1,94\pm 1,45$ mg/l auf $T8_2=1,36\pm 1,27$ mg/l; $T12_2=0,58\pm 0,17$ mg/l).

Im Langzeitverlauf steigen die Werte dann wieder erneut an. Bei Gruppe 1 steigen die Werte sogar kurz signifikant zur Woche 30 über den Ausgangswert. Später unterscheiden sich beide Gruppen zum Zeitpunkt 54 Wochen aber nicht signifikant vom Ausgangswert (Gruppe 1: $T54_1=7,71\pm 1,73$ mg/l; Gruppe 2: $T54_2=7,60\pm 2,41$ mg/l).

Die GAG sinken im Gegensatz zu den anderen Knorpelmarkern unserer Studie nach der Defektsetzung bei beiden Therapiegruppen signifikant ab. Andere Studien haben ebenfalls gezeigt, dass bei akuten Verletzungen, wie zum Beispiel einer Ruptur des vorderen Kreuzbandes die Werte für GAG primär sinken [70]. Nach einer gewissen Latenz nach Traumata steigt der Gehalt an GAG in der Synovialflüssigkeit an [59]. Erst im längeren Verlauf, zu Woche 30, steigen die Werte über den Ausgangswert. Der primäre Abfall der GAG kann durch eine Spülung des Gelenkes bei operativen Eingriffen verursacht sein. Insgesamt sind GAG eher im Langzeitverlauf als Marker zum Nachweis eines Knorpelabbaus zu verwenden.

Beide Gruppen verhalten sich gleich in ihrem Verlauf ihres GAG-Gehalts in der Synovialflüssigkeit. Nach der Defektsetzung zum Zeitpunkt 0 und nach der Therapie zum Zeitpunkt 6 Wochen sinken die Werte Initial ab. Erst im Langzeitverlauf zur Woche 30 und 54 steigen die Werte wieder an. In unserer Studie sind bei Messungen ein Jahr nach der Therapie mit OATS-Zylindern und biphasischen Konstrukten keine signifikant erhöhten GAG-Werte in der Synovialflüssigkeit zu messen.

Studien haben gezeigt, dass die intraartikuläre Konzentration freier Glykosaminoglykane mit dem Ausmaß von Knorpelschäden korreliert [49,50,59,71,72]. Dabei ist die Konzentration von Hyaluronsäure und Chondroitinsulfat in der Gelenkflüssigkeit erhöht [30]. In unserer Studie lassen sich keine signifikant erhöhten Abbauprodukte der Proteoglykane im längeren Verlauf messen. Der Anstieg der MMP zur Woche 24 zeigt, dass es anscheinend zu vermehrten Umbauprozessen am Knorpel, jedoch ohne weiteren Abbau der EZM kommt.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

Titel:

Synoviale Veränderungen bei fokalen osteochondralen Knorpelschäden im Schafsknie

eingereicht von:

prakt. med. Frank Stein

angefertigt an der:

Universität Leipzig, Klinik für Orthopädie, Unfallchirurgie und Plastische
Chirurgie

betreut von:

Prof. Dr. med. Christoph Josten, PD Dr. med. habil. Bastian Marquaß

Biochemische Marker machen es möglich den Knorpelmetabolismus im Gelenk zu untersuchen. Derzeit gibt es wenige Kenntnisse über den Gelenkstoffwechsel nach operativen Knorpelbehandlungen.

Diese experimentelle Studie betrachtet synoviale Veränderungen im Rahmen der Therapie fokaler osteochondraler Defekte im Grosstier, durch autologe Knorpelknochen-Zylinder und biphasische stammzellbasierte Konstrukte.

Dazu wurde Synovialflüssigkeit von 11 Merinoschafen vor und bis zu 1 Jahr nach der Therapie analysiert. In dieser wurden die Zellzahl, Zelldifferenzierung, Tumornekrosefaktor- α , Interleukin-6,

Glykosaminoglykane und Matrixmetalloproteinasen bestimmt.

Von besonderem Interesse waren dabei der Zeitpunkt der Defektbehandlung, mögliche Unterschiede zwischen den beiden Therapiegruppen und der zeitliche Verlauf der Marker.

1. Es konnte gezeigt werden, dass zum Zeitpunkt der Defektbehandlung synoviale Normbedingungen vorherrschten. Die Zellzahl, Lymphozyten, Granulozyten, der Tumornekrosefaktor- α , als auch die Matrixmetalloproteinasen hatten zur Implantation das Ausgangsniveau wieder erreicht. Lediglich der Glykosaminoglykan-Gehalt und die Monozyten lagen unterhalb ihrer Ausgangswerte. Dies lässt jedoch auf einen verminderten Knorpelabbau oder Umbau schließen. Es ist somit nicht davon auszugehen, dass in unserem Defektmodell in eine akute inflammatorische Situation hineinimplantiert wurde.

2. Es zeigten sich in der Zellzahl, dem Tumornekrosefaktor- α , den Matrixmetalloproteinasen und den Glykosaminoglykanen, bei beiden Therapiegruppen keine signifikanten Unterschiede der Werte zu den einzelnen Zeitpunkten untereinander. Beide Gruppen verhielten sich im zeitlichen Verlauf der Marker gleichläufig. Lediglich die Zeitpunkte der Maxima oder gelegentlich die Ausgangswerte variierten etwas voneinander.

3. Sowohl nach der Defektsetzung als auch nach der Therapie der Defekte kam es unabhängig von der Methode zu einem Anstieg der Zellzahl, Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten, des Tumornekrosefaktor- α und der Matrixmetalloproteinasen. Dies lässt eine primäre inflammatorische Reaktion mit Umbau der Knorpelmatrix vermuten. Diese Marker erreichen ein erstes Maximum eine Woche nach Defektsetzung und ein Zweites zwei bis vier Wochen nach der Implantation.

Die Matrixmetalloproteinasen zeigen einen nur geringen ersten und dann einen weitaus höheren Anstieg 24 Wochen nach der Therapie. Dies leiten wir von einer verspäteten Genexpression der Matrixmetalloproteinasen durch den Anstieg des Tumornekrosefaktor- α ab.

Lediglich die Glykosaminoglykane sinken nach der Defektsetzung und der Therapie in ihrem Synovialflüssigkeitsgehalt ab. Dann nach vermehrter

Matrixmetalloproteinase-Ausschüttung steigen diese 24 Wochen nach der Therapie über den Ausgangswert an. Dies ist unabhängig von der Therapiemethode. Dies zeigt, dass der Knorpelmatrix-Umbau erst verspätet einsetzt.

Ein Jahr nach der Knorpeltherapie zeigen sich anhand der letzten Messungen alleine die Lymphozyten und Monozyten der Gruppe mit biphasischen Konstrukten eine leichte Erhöhung über den Ausgangswert. Diese sind jedoch nicht signifikant. Die restlichen Knorpelmarker erreichen dann wieder Werte nahe des Ausgangsniveaus.

Die Analyse von Knorpelmarkern bietet einen neuen und interessanten Ansatz zur Beurteilung operativer Knorpelbehandlungen. Jedoch gibt es derzeit noch keine spezifischen und standardisierten Marker zur Beurteilung des Gelenkknorpels. Angesichts der nur geringen Fallzahlen kann unsere Studie nur deskriptive Ergebnisse zum Gelenkstoffwechsel liefern. Zum genauen Verständnis und objektiven Einschätzen des Gelenkstoffwechsels bedarf es noch weiterer Studien.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

1. Buckwalter JA, Mankin HJ : **Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions.** *Instructional course lectures* 1998:477-486.
2. Pullig O, Pfander D, Swoboda B: **Molecular principles of induction and progression of arthrosis.** *Orthopade* 2001:825-833.
3. Bruckner P, van der Helm J: **Structure and function of cartilage collagens.** *Microsc Res Tech* 1994, **28**:378-384.
4. Garnero P, Rousseau JC, Delmas PD: **Molecular basis and clinical use of biochemical markers of bone, cartilage, and synovium in joint diseases.** *Arthritis Rheum* 2000, **43**:953-968.
5. Kramer J, Bohrsen F, Lindner U, Behrens P, Schlenke P, Rohwedel J: **In vivo matrix-guided human mesenchymal stem cells.** *Cell Mol Life Sci* 2006, **63**:616-626.
6. Mankin HJ: **The response of articular cartilage to mechanical injury.** *J Bone Joint Surg Am* 1982, **64**:460-466.
7. Buckwalter JA, Mankin HJ: **Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation.** *Instructional course lectures* 1998:487-504.
8. Abramson SB, Attur M: **Developments in the scientific understanding of osteoarthritis.** *Arthritis Res Ther* 2009, **11**:227.
9. Goldring MB, Goldring SR: **Osteoarthritis.** *J Cell Physiol* 2007, **213**:626-634.
10. Sledge SL: **Microfracture techniques in the treatment of osteochondral injuries.** *Clin Sports Med* 2001, **20**:365-377.
11. Fritz J, Janssen P, Gaissmaier C, Schewe B, Weise K: **Articular cartilage defects in the knee--basics, therapies and results.** *Injury* 2008, **39** Suppl 1:S50-7.
12. Abramson S, Krasnokutsky S: **Biomarkers in osteoarthritis.** *Bull NYU Hosp Jt Dis* 2006, **64**:77-81.
13. Maletius W, Aigner T: **Morphologie und Molekularpathologie der Osteoarthrose.** *Arthroskopie* 1999, **12**:3-8.
14. Krasnokutsky S, Samuels J, Abramson SB: **Osteoarthritis in 2007.** *Bull NYU Hosp Jt Dis* 2007, **65**:222-228.
15. Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier JP, Fahmi H: **Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis.** *Nat Rev Rheumatol* 2011, **7**:33-42.
16. Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB: **Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets.** *Arthritis Rheum* 2001, **44**:1237-1247.
17. Malfait AM, Verbruggen G, Veys EM, Lambert J, De RL, Cornelissen M: **Comparative and combined effects of interleukin 6, interleukin 1 beta, and tumor necrosis factor alpha on proteoglycan metabolism of human articular chondrocytes cultured in agarose.** *J Rheumatol* 1994, **21**:314-320.
18. Neidel J, Zeidler U: **Independent effects of interleukin 1 on proteoglycan synthesis and proteoglycan breakdown of bovine articular cartilage in vitro.** *Agents Actions* 1993, **39**:82-90.

19. Mitchell PG, Cheung HS: **Tumor necrosis factor alpha and epidermal growth factor regulation of collagenase and stromelysin in adult porcine articular chondrocytes.** *J Cell Physiol* 1991, **149**:132-140.
20. Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP: **The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology.** *Biorheology* 2002, **39**:237-246.
21. Dimmler A, Öhler S, Soeder S, Aigner T: **Knorpelschaden und -regeneration bei Osteoarthrose.** *Arthroskopie* 2005, **18**:174-180.
22. Burrage PS, Mix KS, Brinckerhoff CE: **Matrix metalloproteinases: role in arthritis.** *Front Biosci* 2006, **11**:529-543.
23. Matrisian LM: **Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling.** *Trends Genet* 1990, **6**:121-125.
24. Ishiguro N, Ito T, Ito H, Iwata H, Jugessur H, Ionescu M, Poole AR: **Relationship of matrix metalloproteinases and their inhibitors to cartilage proteoglycan and collagen turnover: analyses of synovial fluid from patients with osteoarthritis.** *Arthritis Rheum* 1999, **42**:129-136.
25. Junqueira LCU, Carneiro J, Kelley RO, Gratzl M, Junqueira-Carneiro-Kelley: *Histologie: Mit 14 Tabellen.* 5th edition. Berlin: Springer; 2002 [Springer-Lehrbuch].
26. Roughley PJ, Lee ER: **Cartilage proteoglycans: structure and potential functions.** *Microsc Res Tech* 1994, **28**:385-397.
27. Buckwalter JA, Rosenberg LC: **Electron microscopic studies of cartilage proteoglycans. Direct evidence for the variable length of the chondroitin sulfate-rich region of proteoglycan subunit.** *J Biol Chem* 1982, **257**:9830-9839.
28. Fassbender HG: **[Pathogenesis of the arthrosis process].** *Verh Dtsch Ges Inn Med* 1989, **95**:447-449.
29. Lohmander LS, Ionescu M, Jugessur H, Poole AR: **Changes in joint cartilage aggrecan after knee injury and in osteoarthritis.** *Arthritis Rheum* 1999, **42**:534-544.
30. Scherer MA, Metak G, Haas B, Hammerschmid E, von GS: **Glycosaminoglycans as markers of post-traumatic gonarthrosis?** *Chirurg* 1998, **69**:82-90.
31. Dahlberg L, Friden T, Roos H, Lark MW, Lohmander LS: **A longitudinal study of cartilage matrix metabolism in patients with cruciate ligament rupture--synovial fluid concentrations of aggrecan fragments, stromelysin-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1.** *Br J Rheumatol* 1994, **33**:1107-1111.
32. Lohmander LS, Hoerrner LA, Lark MW: **Metalloproteinases, tissue inhibitor, and proteoglycan fragments in knee synovial fluid in human osteoarthritis.** *Arthritis Rheum* 1993, **36**:181-189.
33. Walter Baumgartner: *Klinische Propädeutik der inneren Krankheiten und Hautkrankheiten der Haus- und Heimtiere.* 5th edition. Stuttgart: MVS Medizinverlage; 2002.
34. Marquass B, Somerson JS, Hepp P, Aigner T, Schwan S, Bader A, Josten C, Zscharnack M, Schulz RM: **A novel MSC-seeded triphasic construct for the repair of osteochondral defects.** *J Orthop Res* 2010, **28**:1586-1599.
35. Bjornsson S: **Simultaneous preparation and quantitation of proteoglycans by precipitation with alcian blue.** *Anal Biochem* 1993, **210**:282-291.

36. Bjornsson S: **Quantitation of proteoglycans as glycosaminoglycans in biological fluids using an alcian blue dot blot analysis.** *Anal Biochem* 1998, **256**:229-237.
37. Behery O, Siston RA, Harris JD, Flanigan DC: **Treatment of Cartilage Defects of the Knee: Expanding on the Existing Algorithm.** *Clin J Sport Med* 2013.
38. Harris JD, Siston RA, Pan X, Flanigan DC: **Autologous chondrocyte implantation: a systematic review.** *J Bone Joint Surg Am* 2010, **92**:2220-2233.
39. Knutsen G, Engebretsen L, Ludvigsen TC, Drogset JO, Grontvedt T, Solheim E, Strand T, Roberts S, Isaksen V, Johansen O: **Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee. A randomized trial.** *J Bone Joint Surg Am* 2004, **86-A**:455-464.
40. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L: **Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation.** *N Engl J Med* 1994, **331**:889-895.
41. Garnero P, Delmas PD: **Biomarkers in osteoarthritis.** *Curr Opin Rheumatol* 2003, **15**:641-646.
42. Kerolus G, Clayburne G, Schumacher HR, JR: **Is it mandatory to examine synovial fluids promptly after arthrocentesis?** *Arthritis Rheum* 1989, **32**:271-278.
43. Lohmander LS: **Markers of cartilage metabolism in arthrosis. A review.** *Acta Orthop Scand* 1991, **62**:623-632.
44. Rousseau J, Delmas PD: **Biological markers in osteoarthritis.** *Nat Clin Pract Rheumatol* 2007, **3**:346-356.
45. Brannan SR, Jerrard DA: **Synovial fluid analysis.** *J Emerg Med* 2006, **30**:331-339.
46. Nalbant S, Martinez JA, Kitumnuaypong T, Clayburne G, Sieck M, Schumacher HR, JR: **Synovial fluid features and their relations to osteoarthritis severity: new findings from sequential studies.** *Osteoarthritis Cartilage* 2003, **11**:50-54.
47. Haynes MK, Hume EL, Smith JB: **Phenotypic characterization of inflammatory cells from osteoarthritic synovium and synovial fluids.** *Clin Immunol* 2002, **105**:315-325.
48. Revell PA, Mayston V, Lalor P, Mapp P: **The synovial membrane in osteoarthritis: a histological study including the characterisation of the cellular infiltrate present in inflammatory osteoarthritis using monoclonal antibodies.** *Ann Rheum Dis* 1988, **47**:300-307.
49. Fujita Y, Hara Y, Nezu Y, Yamaguchi S, Schulz KS, Tagawa M: **Direct and indirect markers of cartilage metabolism in synovial fluid obtained from dogs with hip dysplasia and correlation with clinical and radiographic variables.** *Am J Vet Res* 2005, **66**:2028-2033.
50. Venn G, Nietfeld JJ, Duits AJ, Brennan FM, Arner E, Covington M, Billingham ME, Hardingham TE: **Elevated synovial fluid levels of interleukin-6 and tumor necrosis factor associated with early experimental canine osteoarthritis.** *Arthritis Rheum* 1993, **36**:819-826.
51. Deng L, Chai B, Li H: **[Bioassay of TNF-alpha in synovial fluid and ultrastructural observation of.** *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 1998, **36**:77-79.

52. Neidel J, Schulze M, Sova L, Lindschau J: **Practical significance of cytokine determination in joint fluid in patients with arthroses or rheumatoid arthritis.** *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 1996, **134**:381-385.
53. Steiner G, Studnicka-Benke A, Witzmann G, Hofler E, Smolen J: **Soluble receptors for tumor necrosis factor and interleukin-2 in serum and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis, reactive arthritis and osteoarthritis.** *J Rheumatol* 1995, **22**:406-412.
54. Vignon E, Balblanc JC, Mathieu P, Louisot P, Richard M: **Metalloprotease activity, phospholipase A2 activity and cytokine concentration in osteoarthritis synovial fluids.** *Osteoarthritis Cartilage* 1993, **1**:115-120.
55. Hay CW, Chu Q, Budsberg SC, Clayton MK, Johnson KA: **Synovial fluid interleukin 6, tumor necrosis factor, and nitric oxide values in dogs with osteoarthritis secondary to cranial cruciate ligament rupture.** *Am J Vet Res* 1997, **58**:1027-1032.
56. Remick DG, DeForge LE, Sullivan JF, Showell HJ: **Profile of cytokines in synovial fluid specimens from patients with arthritis. Interleukin 8 (IL-8) and IL-6 correlate with inflammatory arthritides.** *Immunol Invest* 1992, **21**:321-327.
57. Di GFS, Nuki G, Duff GW: **Tumour necrosis factor in synovial exudates.** *Ann Rheum Dis* 1988, **47**:768-772.
58. Petrovic-Rackov L, Pejnovic N: **Clinical significance of IL-18, IL-15, IL-12 and TNF-alpha measurement in.** *Clin Rheumatol* 2006, **25**:448-452.
59. Sward P, Frobell R, Englund M, Roos H, Struglics A: **Cartilage and bone markers and inflammatory cytokines are increased in synovial fluid in the acute phase of knee injury (hemarthrosis)--a cross-sectional analysis.** *Osteoarthritis Cartilage* 2012, **20**:1302-1308.
60. Dean DD, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Howell DS, Woessner JF, JR: **Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage.** *J Clin Invest* 1989, **84**:678-685.
61. Nguyen Q, Murphy G, Roughley PJ, Mort JS: **Degradation of proteoglycan aggregate by a cartilage metalloproteinase. Evidence for the involvement of stromelysin in the generation of link protein heterogeneity in situ.** *Biochem J* 1989, **259**:61-67.
62. Lefebvre V, Peeters-Joris C, Vaes G: **Modulation by interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha of production of collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinases and collagen types in differentiated and dedifferentiated articular chondrocytes.** *Biochim Biophys Acta* 1990, **1052**:366-378.
63. Tchetverikov I, Lohmander LS, Verzijl N, Huizinga TWJ, TeKoppele JM, Hanemaaijer R, DeGroot J: **MMP protein and activity levels in synovial fluid from patients with joint injury, inflammatory arthritis, and osteoarthritis.** *Ann Rheum Dis* 2005, **64**:694-698.
64. Tchetverikov I, Ronday HK, Van EB, Kiers GH, Verzijl N, TeKoppele JM, Huizinga TW, DeGroot J, Hanemaaijer R: **MMP profile in paired serum and synovial fluid samples of patients with rheumatoid arthritis.** *Ann Rheum Dis* 2004, **63**:881-883.

65. Schmidt-Rohlfing B, Gavenis K, Kippels M, Schneider U: **New potential markers for cartilage degradation of the knee joint.** *Scand J Rheumatol* 2002, **31**:151-157.
66. Billingham RC, Dahlberg L, Ionescu M, Reiner A, Bourne R, Rorabeck C, Mitchell P, Hambor J, Diekmann O, Tschesche H, Chen J, Van WH, Poole AR: **Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage.** *J Clin Invest* 1997, **99**:1534-1545.
67. van dBR, van dH, Brommer H, Brama PA, Barneveld A, van WPR, DeGroot J: **Relationship between synovial fluid levels of glycosaminoglycans, hydroxyproline and general MMP activity and the presence and severity of articular cartilage change on the proximal articular surface of P1.** *Equine Vet J* 2005, **37**:19-25.
68. Lee JH, Fitzgerald JB, Dimicco MA, Grodzinsky AJ: **Mechanical injury of cartilage explants causes specific time-dependent changes in chondrocyte gene expression.** *Arthritis Rheum* 2005, **52**:2386-2395.
69. Rizkalla G, Reiner A, Bogoch E, Poole AR: **Studies of the articular cartilage proteoglycan aggrecan in health and osteoarthritis. Evidence for molecular heterogeneity and extensive molecular changes in disease.** *J Clin Invest* 1992, **90**:2268-2277.
70. Catterall JB, Stabler TV, Flannery CR, Kraus VB: **Changes in serum and synovial fluid biomarkers after acute injury (NCT00332254).** *Arthritis Res Ther* 2010, **12**:R229.
71. Wei L, Fleming BC, Sun X, Teeple E, Wu W, Jay GD, Elsaid KA, Luo J, Machan JT, Chen Q: **Comparison of differential biomarkers of osteoarthritis with and without posttraumatic injury in the Hartley guinea pig model.** *J Orthop Res* 2010, **28**:900-906.
72. Johnson KA, Hay CW, Chu Q, Roe SC, Caterson B: **Cartilage-derived biomarkers of osteoarthritis in synovial fluid of dogs with naturally acquired rupture of the cranial cruciate ligament.** *Am J Vet Res* 2002, **63**:775-781.

IX. SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

1. Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar eine Vergütung oder geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Die aktuellen gesetzlichen Vorgaben in Bezug auf die Zulassung der klinischen Studien, die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes, die Bestimmungen des Gentechnikgesetzes und die allgemeinen Datenschutzbestimmungen wurden eingehalten. Ich versichere, dass ich die Regelungen der Satzung der Universität Leipzig zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis kenne und eingehalten habe.

X. LEBENSLAUF

November 2016	Oberarzt Kantonsspital Nidwalden, Schweiz, Orthopädie
November 2016	mündliche Facharztprüfung Orthopädie und Traumatologie des Bewegungsapparates, Basel
November 2015-Oktober 2016	Assistenzarzt Kantonsspital Nidwalden, Schweiz, Orthopädie
Juni 2015	schriftliche Facharztprüfung Orthopädie und Traumatologie des Bewegungsapparates, Bern
Januar 2014- November 2015	Assistenzarzt Schulthess Klinik Zürich, Schweiz, Orthopädie
Januar 2013-Dezember 2013	Assistenzarzt Spital Limmattal Schlieren, Schweiz, Chirurgie
November 2012	Basisexamen Chirurgie, Bern
Juli 2010-September 2012	Assistenzarzt Klinik GUT, St. Moritz, Schweiz, Orthopädie und Traumatologie
Oktober 2003-Mai 2010	Universität Leipzig, Deutschland Studium der Medizin
Mai 2010	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
September 2005	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Juli 2009-Februar 2010 Deutschland	Forschungsstipendium der Universität Leipzig, Deutschland
1993- März 2002	Otto-Hahn-Gymnasium in Landau i.d.Pfalz Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
April-Dezember 2002	Grundwehrdienst als Hilfsausbilder in Germersheim, Deutschland beim III./ Luftwaffenausbildungsregiment 3

XI. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich meinem Betreuer PD Dr. med. habil. Bastian Marquaß und meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Christoph Josten für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit durchführen zu können, danken. Danke auch für die unkomplizierte Zusammenarbeit, die stetige Hilfe und konstruktive Kritik.

Ich möchte mich recht herzlich bei allen weiteren Personen bedanken, die an der Entstehung dieser Arbeit mitgeholfen haben. Dies sind insbesondere Priv.-Doz. Dr. med. habil. Pierre Hepp, der mich erst zu dieser Arbeit inspiriert hat. Dr. rer. nat. Dipl.-Ing. Ronny Schulz, der die Entstehung und Verwendung der mesenchymalen Stammzell-Konstrukte dieser Arbeit ermöglichte und mich auch jederzeit tatkräftig unterstützte.

Einen ganz besonderen Dank gilt meinen Eltern, ohne deren Unterstützung diese Arbeit und mein Studium nicht möglich gewesen wären und mich von jeher in jeder Hinsicht unterstützt haben.

.